

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

Anoplocefalosis equinas: valoración de la especificidad de los métodos diagnósticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Bohórquez González

DIRECTORAS

Mónica Luzón Peña
Aránzazu Meana Mañes

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**Anoplocefalosis equinas: valoración de la especificidad de los
métodos diagnósticos**

ALEJANDRO BOHÓRQUEZ GONZÁLEZ

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

D^a Mónica Luzón Peña y D^a Aránzazu Meana Mañes, Profesoras Titulares del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, como Directoras de la memoria titulada “Anoplocefalosis equinas: valoración de la especificidad de los métodos diagnósticos” presentada por el licenciado en Veterinaria D. Alejandro Bohórquez Rodríguez para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, certifican que ha sido realizada bajo su dirección y autorizan su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos en Madrid a 19 de octubre de dos mil quince.

Fdo: M. Luzón Peña

Fdo: A. Meana Mañes

*A mi Lau
Y a mis Padres
(mis mejores maestros)*

AGRADECIMIENTOS

Quiero y debo agradecer en estas líneas la ayuda de muchas personas que de una u otra manera han colaborado durante todo el proceso de investigación y redacción de este trabajo de tesis doctoral.

En primer lugar a mis directoras, Dra. Aránzazu Meana y Dra. Mónica Luzón Peña, gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Han (habéis) hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su (vuestra) guía, ayuda y sobre todo amistad. Gracias por la incalculable formación académica que me han (habéis) aportado durante tantos años y por hacerme sentir parte de vuestras vidas.

Gracias a todas las personas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y muy especialmente a todos los miembros del Departamento de Sanidad Animal por su atención y amabilidad en todo lo referente a mi vida como alumno de doctorado.

A todos y cada una de las chicas del laboratorio (Ana, Rosa, Diana, Leticia, Rocío, Valentina, Marta y Carmen), que durante todos estos años me han dado su cariño y apoyo para que todas las mañanas hayan sido ilusionantes y alegres. ¡Gracias también por todos esos ratos fuera de nuestro amado laboratorio!

Quiero hacer una mención muy especial a todos los jefes de grupos con los que he tenido el gusto de aprender algo de ciencia y mucho de humanidad como Lupe, Sonia, Maite, Santa y Bruno.

Muchas gracias a Nélida por su eterna disponibilidad, su interés y motivación en el trabajo y por enseñarme a ser tan meticuloso en el laboratorio.

A mis compañeros veterinarios, Miguel y Elkin, por esos fantásticos muestreos en el sur de España y esas agotadoras horas rodeados de un lenguaje tan extraño, tan almonteño, tan difícil de entender para un colombiano como yo. Miguel, ¡jamás olvidare esos días africanos de sonrisas y silencios!

Este trabajo no hubiera podido ver la luz sin el insustituible material procedente de los diversos mataderos que hemos muestreado. Deseo agradecer la ayuda y colaboración de los profesionales veterinarios del matadero de León y Segovia.

Todo este material no hubiera podido llegar a mis manos sin la generosa ayuda de Agustín. Gracias de todo corazón por todos esos largos y tediosos viajes para traer las tripas cerca de mí. Cómo no olvidar a Pascual, quien me enseñó todos los trucos para hacerme con todo tipo de reactivos y parásitos, con esa eterna sonrisa que nunca olvidaré.

No puedo por menos que extender todo mi agradecimiento al Centro Apícola Regional de Marchamalo, y a sus cabezas visibles Raquel y Mariano. Jamás olvidaré la simpatía y ayuda que siempre encontré en todas las chicas de ese laboratorio y en Jesús y Javi; gracias a todo el magnífico equipo de trabajo que tenéis. En mi corazón y retina también estarán esos pequeños seres con las que compartí tantas y tantas tardes al microscopio. Gracias Nosema por participar en mi supervivencia.

Debo agradecer al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, muy especialmente al Dr. Francisco Rojo, por todo el conocimiento brindado, así como su apoyo y el permitirme compartir tardes de sabiduría y charlas distendidas en las que yo era un gran espectador y en las que siempre me he sentido parte de esa familia. Extiendo mi agradecimiento a María Martínez del Instituto de Ganadería de Montaña de Marzanas y a José Antonio Castro del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.

Gracias a todos aquellos que no están en este texto y que una u otra forma han formado parte de todo el bagaje de competencias y conocimientos que me llevo puesto y que, si no los he mencionado uno por uno, ha sido indiscutiblemente porque debo terminar todo esto antes de casarme.

Pero no puedo terminar sin agradecer de todo corazón a tres personas imprescindibles en mi vida.

Muchas gracias a mis padres. Mi madre y mi padre han sido toda su vida unos magníficos profesores y han sido mi mayor ejemplo de sencillez, educación y perseverancia. Sobra decir que sin ellos no soy nada y que casi todo lo que hago es para hacerles sentir orgullosos y contentos. *Muchas gracias por vuestro amor incondicional, vuestra fe ciega en mí, y sobre todo por haberme mostrado desde chico de manera tan clara cuál es el camino hacia la felicidad, os admiro mucho.* Toda mi familia en la distancia siempre me ha apoyado y animado a continuar, a ellos extiendo mi agradecimiento de todo corazón.

Por último, quiero agradecer a la persona mas importante en mi vida, quien día a día me anima y es el principal motor para llevar a cabo cualquier proyecto. Lau, gracias por estar siempre a mi lado, entenderme, apoyar mis decisiones y sobretodo por saber manejar mi carácter e intentar hacer de mi una mejor persona, el tenerte y pensar en ti han sido la principal motivación para finalizar este largo trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 1
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	Pág. 7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	Pág. 9
3.1. Etiología de las cestodosis equinas.....	Pág.9
3.2. Taxonomía de las spp. de cestodos parásitas de los équidos.....	Pág. 10
3.3. Morfología de las spp. de cestodos parásitas de los équidos.....	Pág. 10
3.3.1. Morfología de <i>Anoplocephala perfoliata</i>	Pág. 12
3.3.2. Morfología de <i>Anoplocephala magna</i>	Pág.14
3.3.3. Morfología de <i>Anoplocephaloides mamillana</i>	Pág. 14
3.3.4. Morfología de <i>Moniezia pallida</i>	Pág. 15
3.4. Biología de las especies de cestodos parásitas de los équidos.....	Pág. 15
3.5. Epidemiología de las cestodosis equinas.....	Pág. 18
3.6. Patología de las cestodosis equinas.....	Pág. 19
3.6.1. Patología de la infección por <i>A. perfoliata</i>	Pág. 19
3.6.2. Patología de otras cestodosis equinas.....	Pág. 21
3.7. Diagnóstico de las cestodosis equinas.....	Pág. 22
3.7.1. Diagnóstico coprológico.....	Pág. 23
3.7.2. Diagnóstico inmunológico.....	Pág. 25
3.7.3. Diagnóstico molecular.....	Pág. 28
3.7.4. Diagnóstico <i>post-mortem</i>	Pág. 30
3.8. Tratamiento de las cestodosis equinas.....	Pág. 30
4. RESULTADOS.....	Pág. 32
4.1. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO	
4.1.1. Resumen.....	Pág. 32
4.1.2. “Coprologically diagnosing <i>Anoplocephala perfoliata</i> in the presence of <i>A. magna</i>”	Pág. 35
4.2. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR	
4.2.1. Resumen.....	Pág. 49
4.2.2. “New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm”	Pág. 52

4.3. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

4.3.1. Resumen.....	Pág. 74
4.3.2. “Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic <i>Anoplocephala perfoliata</i> and <i>Anoplocephala magna</i> antigens”	Pág. 76
4.3.3. Anexo I. Resultados no publicados del inmunodiagnóstico.- ELISA.....	Pág. 96
4.3.4. Anexo II. Resultados no publicados del inmunodiagnóstico.- Proteómica.....	Pág. 101
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	Pág. 105
6. CONCLUSIONES.....	Pág. 115
7. RESUMEN.....	Pág. 117
8. SUMMARY.....	Pág. 122
9. REFERENCIAS.....	Pág. 127
10. ANEXO DE PUBLICACIONES.....	Pág. 138

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La cría de animales de las distintas razas equinas es una actividad de gran tradición en España. Los équidos criados en España han gozado históricamente de reconocimiento a nivel mundial. España ha desarrollado siempre una gran actividad en la cría de caballos, asnos e híbridos mulares, cuando antiguamente estos últimos eran empleados en las tareas agrícolas o para la monta por religiosos y mujeres. El sector ganadero equino no sólo se encuentra presente en el ámbito relacionado con la producción primaria, sino también con otros sectores como el turismo rural, actividades deportivas, culturales y educativas e incluso terapéuticas. Según el último informe elaborado por el MAGRAMA sobre el sector equino (MAGRAMA 2014), España sigue siendo uno de los países europeos con mayor censo de equinos; tras décadas de disminución sistemática, a partir del año 2007 el censo experimentó un claro incremento tras la implantación de planes nacionales específicos para su mejora, si bien en los últimos años el censo ha vuelto a descender significativamente por razones puramente económicas.

De acuerdo con los datos actualizados por dicho informe a junio de 2014, existen unas 184.500 explotaciones de equino en España, de las cuales la mayor parte (33,8%) son explotaciones no comerciales y otro gran porcentaje (22,1%) no tienen uso clasificado; 16,8% son de uso particular; 1,8% se destinan a selección y cría y en torno al 9% a producción de carne. La mayor parte del censo se concentra en Andalucía (40%) y de manera uniforme por el resto de regiones, destacando Galicia, Castilla y León y Extremadura.

La producción de carne se situó en unas 11.500 toneladas en 2013, siendo, Navarra, Aragón, Cataluña, Castilla y León y la Comunidad Valenciana y los principales lugares de sacrificio. El comercio de animales con la Unión Europea, para dicho fin se realiza principalmente con Italia y en mucha menor medida con Francia, Portugal y Bélgica.

En los últimos años la situación económica de España ha provocado que los altos costes de mantenimiento de estos animales conllevaran el abandono de muchos de ellos. La falta de mercado de venta, alquiler o doma de los animales vivos han causado que muchos animales fueran sacrificados a partir de 2010, de manera que en los años 2011 y 2012 la producción cárnica aumentó en más de

4.000 toneladas anuales. Aunque la tendencia se invirtió en el año 2013 y cayó en unas 4.000 toneladas, la producción seguía siendo muy superior a la de tres años atrás. Uno de los problemas derivados de esta cantidad de carne de caballo ha sido su presencia en derivados cárnicos de otras especies, lo que socialmente ha tenido una gran repercusión en los consumidores. El fraude se convirtió en alarma cuando se verificó que muchos de estos productos procedían de animales de alta competición o de compañía a los que casi de forma rutinaria se les administraba fármacos que impedían su consumo humano. Este hecho se refleja en la detección en 2013 de fenilbutazona (AINE) en carne de caballos destinados a consumo humano que entraron de forma ilegal en la cadena alimentaria en el Reino Unido.

A diferencia de otras producciones ganaderas, la producción de équidos, principalmente caballos y, en menor medida, burros y asnos, se orienta hacia la actividad deportiva y de ocio y, de manera muy residual, a las tareas agrícolas y la producción de carne. Sin embargo, éste no es el único carácter diferenciador de este subsector de la producción animal. Destaca igualmente por la gran movilidad que se lleva a cabo con los ejemplares, empleados en romerías, exhibiciones y competiciones deportivas. Esta movilidad no deja de convertirse en un vehículo de difusión de enfermedades, como lo es también el hecho peculiar de que tanto los establecimientos de cría como los que alberguen animales pertenecientes a distintos propietarios, generan una serie de rasgos peculiares que requieren un especial énfasis en el control de las enfermedades transmisibles, labor de control difícil por parte de las autoridades al ser éstos animales de varios dueños.

Por otra parte, la multifuncionalidad de algunos establecimientos y la especificidad de una demanda muy segmentada requieren de conocimientos y habilidades profesionales que no se exigen en otras producciones animales. La tipología de las explotaciones de caballos también es peculiar, pudiéndose distinguir varios tipos, con un impacto diferente en los posibles programas de control sanitario.

Las explotaciones de cría y selección de razas puras se orientan hacia la obtención y comercialización de animales selectos que cumplan con el programa de mejora genética de la raza, que estén inscritos en los libros genealógicos y que cumplan el correspondiente programa sanitario. El régimen de explotación de las

razas puras puede ser de tipo intensivo, semi-intensivo o extensivo, pudiendo tener carácter público (yeguas militares, depósitos de sementales y otros centros de selección de razas nacionales o autonómicas) o privado (ganaderías y centros de reproducción privados).

Otro tipo de explotación de caballos tiene lugar en los establecimientos para la práctica ecuestre, donde se alojan animales destinados a la equitación. El régimen de este tipo de explotaciones suele ser intensivo, ya que los caballos pasan todo el tiempo estabulados, excepto cuando salen a entrenar. Se suelen ubicar principalmente en las proximidades de grandes núcleos urbanos y albergan équidos con una gran movilidad para el desarrollo de sus actividades recreativas, deportivas o turísticas.

Un tercer tipo de explotación sería la que se corresponde con la aptitud cárnica. Este tipo de explotaciones se dedican a la cría o al engorde para carne. Las primeras se concentran casi exclusivamente en la mitad norte de la península, con orientación extensiva en semi-libertad, mientras que las segundas (dedicadas al cebo de potros con destino a sacrificio y producción cárnica) se encuentran principalmente en el Levante, sobre todo en la Comunidad Valenciana y Cataluña y, en menor número, en la cornisa cantábrica y Navarra. En las explotaciones más grandes del Levante, que pueden llegar a albergar hasta 1.000 caballos, éstos se distribuyen por edades en lotes de 20-30 animales, pasando por diferentes instalaciones, las cuales se corresponden con las distintas fases del cebo, igual que en el ganado vacuno.

Además de aquellas que producen o explotan équidos como actividad principal, existen otras explotaciones agrícolas con producción equina complementaria, ya sea por optimización de pastos o como ayuda en las tareas propias de dichas fincas. Así, es muy frecuente la producción equina complementaria en explotaciones extensivas de vacuno de carne o lidia, con base en la dehesa o las marismas. Éstas suelen ser de régimen extensivo, si bien generalmente disponen de unas instalaciones básicas para el alojamiento de los animales. De estas explotaciones a menudo también se obtienen animales, sobre todo de razas cruzadas, que son empleados en corridas de toros y de rejones y concursos de doma vaquera, acoso y derribo, y turismo rural. Igualmente existe un

gran número de pequeñas explotaciones particulares dedicadas al mantenimiento de un número reducido de animales sin fin lucrativo destinados a uso particular.

Todas estas peculiaridades influyen directamente en la exposición y riesgo de los animales de adquirir un agente infectocontagioso y deben ser consideradas en el establecimiento de cualquier programa sanitario. Entre las enfermedades de carácter transmisible que los équidos pueden padecer están las producidas por agentes parasitarios, sobre todo aquellas relacionadas con la ingestión de pasto. Entre ellas, destacan las causadas por helmintos, tanto nematodos como cestodos. La presencia de estos últimos se ha relacionado recientemente con la aparición de cuadros cólicos, por lo que su detección en animales es fundamental para incluirlos en los planes de desparasitación.

El desarrollo de técnicas y métodos que faciliten la identificación de las causas implicadas en patologías diversas, ha contribuido notablemente a lograr estatus sanitarios de alto nivel. En relación con los procesos parasitarios, tiene una gran trascendencia la posibilidad de estimar la biomasa que alberga un animal y su relación con parámetros que pueden determinarse mediante técnicas de laboratorio, tanto clásicas como modernas. Todo ello con la finalidad de establecer pautas terapéuticas y/o profilácticas correctas (Thompson, 1999; Coles, 2001).

Aunque se dispone actualmente de técnicas cada vez más sensibles y específicas para el diagnóstico y el seguimiento de la dinámica de las infecciones parasitarias de los animales de compañía y útiles, existen todavía muchas lagunas que es preciso rellenar. Como en otras situaciones, se plantean retos que deben ser abordados con técnicas y medios cada vez más adecuados para permitir conocer, por ejemplo, los aspectos dinámicos de muchas enfermedades cuyos patrones epidemiológicos se ven modificados por los cambios que se producen en la sociedad y en el entorno. En ese contexto, deben adquirir un especial protagonismo los veterinarios parasitólogos cuya actuación contribuye a la solución de los problemas (Thompson, 1999).

La mayoría de los programas actuales de control antiparasitario en équidos hacen especial hincapié en las infecciones que producen las diversas especies de nematodos gastrointestinales y en las infestaciones producidas por larvas de

moscas, dejando en un lugar secundario a otras parasitosis que tienen, sin embargo, gran importancia.

En efecto, entre las “otras parasitosis” se encuentran las cestodosis, que están producidas por especies de cestodos que viven en el tracto digestivo de los équidos. En España, hay que referirse casi exclusivamente a tres especies de cestodos pertenecientes a la familia Anoplocephalidae. La más cosmopolita y frecuente es *Anoplocephala perfoliata* (Chapman *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2004; Gasser *et al.*, 2005) que hasta finales de los ‘90 no se había asociado – de una forma más o menos directa – a trastornos digestivos; sin embargo, en los últimos años la situación ha cambiado y actualmente *A. perfoliata* se asocia cada vez más con la presentación de trastornos intestinales, como irritación, intususcepción y obstrucción de diverso grado (Proudman *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2004; Gasser *et al.*, 2005). Además, parece evidente que la infección por *A. perfoliata* aumenta significativamente el riesgo de presentación de impactación del íleon y cólicos espasmódicos (Proudman *et al.*, 1998), por lo que es necesario disponer de métodos de mayor sensibilidad y especificidad que ayuden al diagnóstico.

En los últimos años, estos métodos de diagnóstico han ido mejorando poco a poco en un intento de poder detectar huevos en las heces, anticuerpos específicos en el suero, o antígenos específicos del parásito en las heces o, más recientemente, amplificar el DNA del parásito en las heces mediante técnicas moleculares.

Todos estos métodos se han fundamentado en la detección de *A. perfoliata*, asumiendo que ésta es única especie relevante. Esto se ha considerado así en gran parte de Europa, incluida España, donde *A. perfoliata* había sido la única especie denunciada hasta el año 2002. Sin embargo, a partir de la primera detección de la infección por *Anoplocephala magna* en équidos en España (Meana *et al.*, 2002), posteriormente verificada su prevalencia en infección simple (18%) o mixta con *A. perfoliata* (11%) (Meana *et al.*, 2005), el diagnóstico específico entre ambas especies de *Anoplocephala* se ha hecho imprescindible, dado su diferente patrón estacional (Meana *et al.*, 2005) y la ausencia de patogenicidad atribuida a esta segunda especie. Es probable que, dada la similitud morfológica entre los huevos de ambas especies, la infección por *A. magna* haya sido infravalorada en otros países de nuestro entorno.

Una tercera especie descrita en los équidos es *Anoplocephaloides mamillana* que también se ha encontrado en España con una bajísima prevalencia (un animal positivo entre más de seiscientos necropsiados, según propia experiencia). Por su falta de patogenicidad, es otro candidato a ser incluido en el diagnóstico diferencial de las cestodosis por *A. perfoliata*.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las diferencias en patogenicidad y epidemiológicas entre las infecciones por las dos *Anoplocephala* spp. justifican la necesidad de diagnósticos diferenciales en países como España, donde la parasitación por *A. magna* en infección pura o mixta con *A. perfoliata* está demostrada (Meana *et al.*, 2005).

En relación con el diagnóstico coprológico, a la gran variabilidad existente en la sensibilidad de detección de huevos hay que añadir los problemas de inespecificidad. De hecho, en áreas donde coexisten *A. perfoliata* y *A. magna*, el diagnóstico coprológico tiene una gran limitación, y es la similitud morfológica entre los huevos de *Anoplocephala* spp. En cuanto a los métodos de diagnóstico inmunológico, todas las técnicas actualmente disponibles han sido diseñadas para la detección de la infección por *A. perfoliata* y no han sido probadas con caballos infectados por *A. magna*, por lo que se desconoce su especificidad real en la distinción entre ambas especies. Por último, el diagnóstico molecular se basa actualmente en una PCR cuya especificidad en la detección de *A. perfoliata* ha sido contrastada frente a *A. mamillana*, pero no frente a *A. magna*, por lo que, como ocurre con el inmunodiagnóstico, se desconoce su especificidad real en la distinción entre las dos especies de *Anoplocephala* presentes en España.

Con la elaboración de la presente memoria de tesis doctoral, queremos contribuir a la mejora del diagnóstico de las cestodosis equinas mediante los siguientes objetivos:

2.1. Objetivos del diagnóstico coprológico:

Objetivo 1a.- Evaluar la fiabilidad del diagnóstico coprológico en la detección de *A. perfoliata* en áreas donde coexiste la infección por *A. magna*, mediante la comparación de la sensibilidad de dicho diagnóstico en la detección de cada especie.

Objetivo 1b.- Analizar la fiabilidad de dos variables morfométricas (diámetro de la oncosfera y bisectriz mayor de la cubierta) en la diferenciación entre los huevos de ambas *Anoplocephala* spp.

2.2. Objetivos del diagnóstico molecular:

Objetivo 2a.- Diseñar nuevos cebadores específicos para la identificación de *A. magna* y de *A. mamillana*.

Objetivo 2b.- Diseñar una PCR que permita la detección específica y simultánea de las tres principales especies de cestodos parásitos de los équidos (*A. perfoliata*, *A. magna* y *A. mamillana*).

2.3. Objetivos del diagnóstico inmunológico:

Objetivo 3a.- Evaluar la especificidad del antígeno E/S de 12/13 kDa de *A. perfoliata* en el diagnóstico diferencial con *A. magna*.

Objetivo 3b.- Obtener y caracterizar antígenos crudos E/S y somáticos de *A. magna*, compararlos con los antígenos homólogos de *A. perfoliata* y evaluar su utilidad potencial en el diagnóstico diferencial entre ambas *Anoplocephala* spp.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Etiología de las cestodosis equinas

Las cestodosis son parasitosis causadas por las fases adultas de diversas especies de cestodos en sus hospedadores definitivos. En los équidos, los cestodos responsables pertenecen exclusivamente a la familia Anoplocephalidae Blanchard, 1891, dentro del orden Cyclophyllidea, con dos géneros principales: *Anoplocephala* Blanchard, 1848 y *Anoplocephaloides* Baer, 1923, a los que pertenecen tres especies, dos al género *Anoplocephala*: *A. perfoliata* Goeze, 1782 y *A. magna* Abildgaard, 1789, y la tercera, al género *Anoplocephaloides*: *A.* (sin. *Paranoplocephala*) *mamillana* Mehlis, 1831. Como especie menor cabe citar a *Moniezia pallida* Mönnig, 1926, perteneciente a la misma familia. Con excepción de esta última especie, descrita únicamente en cebras en África del sur y en Angola (Möning, 1925), las otras tres especies de cestodos se hallan presentes tanto en los caballos, como en los asnos, mulos y cebras de diferentes partes del mundo. De todas ellas, *A. perfoliata* es la más frecuente y tiene una distribución cosmopolita (Chapman *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2004; Gasser *et al.*, 2005). Las infecciones producidas por dichas especies reciben la denominación de anoplocefalidosis.

Los anoplocefálidos se localizan en el intestino delgado o en los primeros tramos del ciego y originan en los équidos cuadros de enteritis de distinta magnitud que pueden manifestarse por dolores cólicos y adelgazamiento (Tarazona Vilas, 1999).

Los équidos que tienen acceso directo al pasto tienen un mayor riesgo de infección, aunque los animales estabulados también desarrollan infecciones cuando son suplementados o alimentados con forrajes frescos contaminados con ácaros oribátidos, hospedadores intermediarios, parasitados.

3.2. Taxonomía de las especies de cestodos parásitas de los équidos

El encuadre taxonómico de las especies de cestodos que parasitan a los équidos es el siguiente (ver Denegri *et al.*, 1998):

Phylum Platyhelminthes

Clase Cestoda (Cestoidea)

Subclase Eucestoda

Orden Cyclophyllidea

Familia Anoplocephalidae Blanchard, 1891

Género *Anoplocephala* Blanchard, 1848

A. perfoliata Goeze, 1782

A. magna Abildgaard, 1789

Género *Anoplocephaloides* Baer, 1923

A. mamillana Mehlis, 1831

Género *Moniezia* Blanchard, 1891

M. pallida Mönnig, 1926

3.3. Morfología de las especies de cestodos parásitas de los équidos

La morfología de las especies de cestodos objeto de esta memoria ha sido descrita a nivel de género por Schmidt (1986) y, más detalladamente, a nivel de especie, por Lichtenfels (1975) y French y Chapman (1992). Los cestodos adultos que infectan a los équidos son de color blanco o amarillo claro, se caracterizan por tener un escólex desprovisto de rostelo e inerte durante todas las etapas del desarrollo, de forma globulosa y dotado de cuatro ventosas igualmente desarmadas y de fuerte musculatura. A continuación del escólex está el cuello, corto y poco diferenciado, cuyas células germinales dan lugar al desarrollo del cuerpo del cestodo, también llamado estróbilo, con segmentos más anchos que largos, separados claramente entre ellos, que se denominan proglotis, que tienen poros genitales unilaterales y dotación genital sencilla, en los géneros

Anoplocephala y *Anoplocephaloides*, o poros genitales bilaterales y dotación genital doble en el género *Moniezia*. Según el grado de desarrollo, se clasifican en proglotis inmaduros, maduros y grávidos, siendo los grávidos los que se hallan en la parte distal del cuerpo.

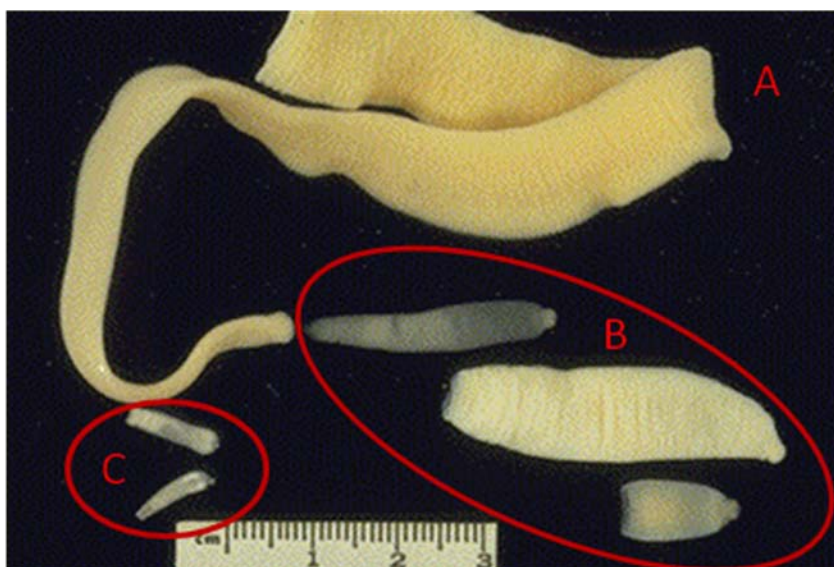


Figura 1. Representación comparativa de los tres principales cestodos de los équidos. A: *Anoplocephala magna*; B: *Anoplocephala perfoliata*; C: *Anoplocephaloides mamillana*.

Como cestodos, son hermafroditas, con dotación genital masculina y femenina en cada proglotis. El ovario es multilobulado y ocupa generalmente toda la anchura del parénquima medular, donde se alojan además numerosos testículos. El útero es sacciforme y dispuesto transversalmente y contiene huevos, rodeados por una cápsula no operculada, que maduran en grandes cantidades dentro del útero en los proglotis grávidos, que se separan del cuerpo del cestodo y se rompen permitiendo así la salida de los huevos. Los huevos poseen tres cubiertas: una membrana vitelina externa, una capa media albuminosa y, rodeando a la oncosfera, una membrana interna quitinosa con forma de pera y con un par de proyecciones con aspecto de ganchos que suelen entrecruzarse; esta estructura recibe el nombre de aparato piriforme (Fig. 2) (Tarazona Vilas, 1999). En estos cestodos la oncosfera, embrión totalmente desarrollado, también denominada embrión hexacanto por poseer tres pares de ganchos, permanece pasiva en el interior del

huevo, hasta que éste es ingerido por un hospedador intermediario (ácaros oribátidos), en cuyo aparato digestivo se libera la oncosfera invadiendo las microvellosidades intestinales y se transforma en una larva que se denomina cisticercoide.

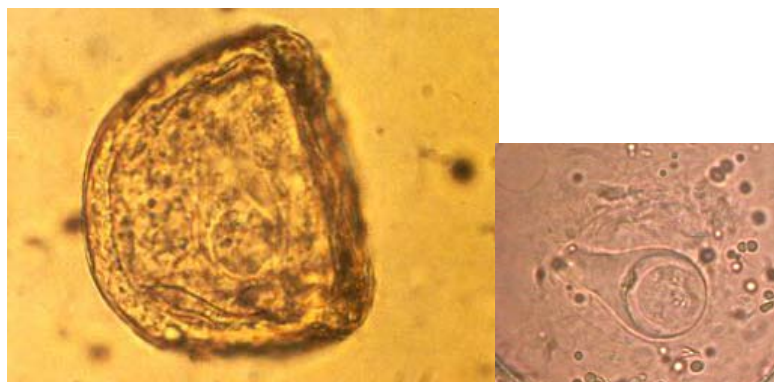


Figura 2. Huevo de *Anoplocephala* spp. (izqda) y detalle del aparato piriforme (dcha). (x 400).

3.3.1. Morfología de *Anoplocephala perfoliata* Goeze, 1782

Anoplocephala perfoliata llega a medir de 2 a 8 cm de largo y de 1,5 a 2 cm de ancho. Su escólex pequeño, musculado y de forma cúbica, mide menos de 3 mm de diámetro, presentando en su parte anterior cuatro ventosas cónicas y en su parte posterior, dorsal y ventralmente dirigidos hacia atrás, cuatro pequeños apéndices en forma de hoja, lóbulo o solapa (Fig. 3). A continuación, la zona de inicio de los proglotis es muy estrecha y éstos son gruesos, más anchos que largos y se encajan entre sí por su parte central (Fig. 4). Poseen órganos sexuales simples. Los testículos son unos 200, extendidos por toda la anchura medular del anillo; la bolsa del cirro mide 500 x 200 μm y el conducto deferente se ensancha para formar una vesícula seminal interna y otra externa. La vagina se abre detrás de la bolsa del cirro. El ovario está formado por dos alas desiguales que ocupan toda la anchura medular del anillo y la glándula vitelógena se sitúa detrás de él. El útero, inicialmente tubular y transversal, se hace después sacciforme y lobulado. Los huevos tienen una cubierta esférica con un lado plano, lo que les confiere una forma típica de "D" y miden 65-80 μm de diámetro (Soulsby, 1987; Tarazona Vilas, 1999; Gasser *et al.* 2005) y contienen una oncosfera de 16 μm de diámetro, rodeada por un aparato piriforme (Fig. 2). Los cestodos adultos se encuentran

preferentemente ubicados en el ciego, en las proximidades de la válvula íleocecal y, en ocasiones, en la parte final del ileon de caballos, asnos, mulos y cebras (Borchert, 1981; Soulsby, 1987). En ejemplares de cestodos inmaduros, es difícil a veces diferenciar *A. perfoliata* de *A. magna*.



Figura 3. Escólex de *A. perfoliata* (izqda.) y *A. magna* (dcha.)



Figura 4. Ejemplares adultos de *A. perfoliata* (izqda.) y *A. magna* (dcha.)

3.3.2. Morfología de *Anoplocephala magna* Abildgaard, 1789

Anoplocephala magna alcanza hasta 80 cm de largo por 2 cm de ancho, tiene un escólex grande y cuadrangular globuloso, de 4-6 mm de anchura, situándose la abertura de las cuatro ventosas en su parte anterior (Fig. 3), carece de las solapas características de *A. perfoliata*. El estróbilo se ensancha hacia su mitad de su longitud total y después se estrecha (Fig. 4). Los testículos son pequeños (52 μm) en número de 400 a 500 y se localizan en tres o cuatro capas por toda la anchura del anillo. La bolsa del cirro mide 1,4 mm x 10 μm . Hay una vesícula seminal interna y otra externa. Los huevos son morfológicamente similares a los de *A. perfoliata*, con cubierta en forma de "D" (Fig. 2) cuyo diámetro mide entre 50-60 μm (Soulsby, 1987) y 70-80 μm (Tarazona Vilas, 1999) y tienen una oncosfera de 8 μm de diámetro (Tarazona Vilas, 1999) rodeada por un aparato piriforme bien desarrollado. Esta especie se localiza en los primeros tramos del intestino delgado y en ocasiones se han observado en el estómago del caballo, asno, mulo y cebrá (Borchert, 1981; Soulsby, 1987).

3.3.3. Morfología de *Anoplocephaloides mamillana* Mehlis 1831

Los cestodos del género *Anoplocephaloides* tienen poros genitales unilaterales o irregularmente alternos. El ovario es más estrecho que la vagina, los testículos están próximos al ovario, aunque en el lado contrario al poro genital y el útero tiene forma tubular al principio y después, sacciforme y lobulado y los huevos también están provistos de aparato piriforme.

Anoplocephaloides mamillana, anteriormente denominada *Paranoplocephala mamillana* Mehlis, 1831, llega a medir 6 mm de largo por 0,5 a 1 mm de ancho (Fig. 1). El escólex, pequeño y cuadrangular redondeado, mide 700 μm de diámetro y está provisto de cuatro ventosas poco prominentes y de hendidura longitudinal. Los proglotis son muy cortos y su estróbilo se ensancha rápidamente después del escólex, alcanza pronto su máxima anchura y la conserva hasta el final, que pueden constituir unos 30 a 50 segmentos. Posee poros genitales unilaterales. Hay entre 70 y 100 testículos, que se disponen en varias capas en el parénquima, desde la mitad del proglotis opuesta al poro genital. Presenta una

vesícula seminal externa y otra interna, ésta última desarrollada y piriforme. La vagina se abre posterior y ventralmente a la bolsa del cirro y se dilata formando un receptáculo seminal voluminoso. El útero, inicialmente tubular y transversal, se dilata y forma divertículos, llegando a ocupar todo el anillo. Los huevos tienen forma oval, miden unos 51 x 37 μm (Soulsby, 1987) y contienen una oncosfera rodeada por un aparato piriforme. Esta especie se localiza en el intestino delgado y, a veces, en el estómago del caballo (Borchert, 1981; French y Chapman, 1992; Tarazona Vilas, 1999).

3.3.4. Morfología de *Moniezia pallida* Mönnig, 1926

Los cestodos del género *Moniezia* poseen órganos genitales dobles en cada proglotis. Los proglotis son craspedotas. El útero, inicialmente reticular se hace finalmente sacciforme y sobrepasa lateral y ventralmente los canales excretores, ocupando todo el proglotis grávido. Poseen glándulas interproglotídeas.

Moniezia pallida tiene una longitud de hasta 1,38 m y una anchura máxima de 2,1 cm. El escólex mide alrededor de 700 μm de diámetro y está provisto de cuatro ventosas. Los proglotis son más anchos que largos y tienen glándulas interproglotídeas difusas. Los poros genitales se sitúan en la mitad anterior de los bordes laterales de cada proglotis y la bolsa del cirro mide 230 x 80 μm . Los testículos son pequeños y muy numerosos y ocupan la parte central, entre ambos ovarios. El útero desarrollado presenta ramificaciones que alcanzan dorsal y ventralmente los canales excretores. Esta especie se ha descrito en el intestino delgado de cebras del continente africano (Möning, 1925).

3.4. Biología de las especies de cestodos parásitas de los équidos

Una característica única de esta familia, además de su escólex inerme, es la necesidad de utilizar a los ácaros oribátidos (Fig. 5) del suelo como hospedadores intermediarios (Stunkard, 1938; Bashkirova, 1941; Sengbusch, 1977). Se han citado hasta 18 especies pertenecientes a 14 géneros que pueden actuar como tales en el ciclo biológico de *A. perfoliata* (Narsapur, 1988; Denegri, 1993; Denegri *et al.*, 1998); los más frecuentemente implicados son del género *Scheloribates*, *Galumna*,

Achipteria y *Ceratozetes* (Borchert, 1981; Narsapur, 1988). Todas las familias de oribátidos observadas pueden actuar en el ciclo biológico de los anoplocefálicos, siendo la familia Scheloribatidae la mas prevalente en el norte de España (Fernández Pato, 2013).



Figura 5. Ácaros oribátidos (x40), hospedadores intermediarios de cestodos anoplocefálicos de équidos. Imagen cedida por la Dra. N. Fernández-Pato.

En el hospedador definitivo, la ubicación habitual de *A. magna* y *A. mamillana* suele ser el intestino delgado, mientras que *A. perfoliata* se fija en la porción distal del íleon y en el ciego, sobre todo de forma focalizada alrededor de la válvula ileocecal (Fig. 6). Los huevos de estos cestodos se excretan con las heces al ser liberados de los proglotis grávidos o dentro de ellos, por el movimiento del tránsito intestinal; una vez en el exterior están disponibles para ser ingeridos por los ácaros del suelo.

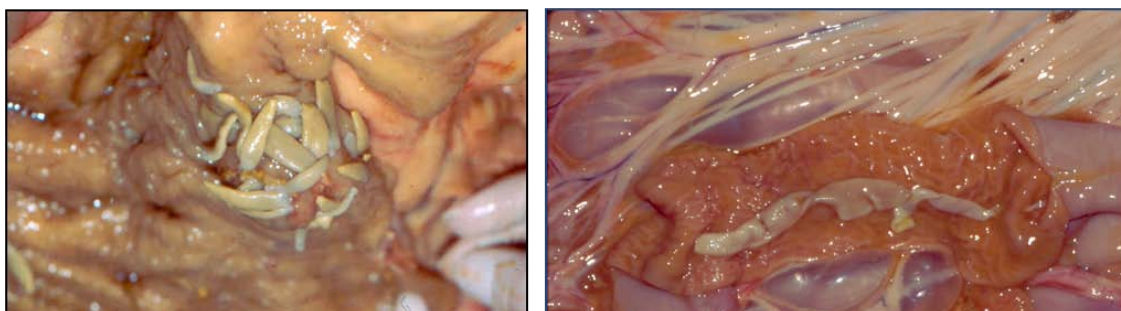


Figura 6. Localización de *A. perfoliata* en válvula ileocecal (izqda) y de *A. magna* en intestino delgado (dcha).

Ya en el suelo, una vez ingerido el huevo por los ácaros oribátidos, la oncosfera se libera del huevo y perfora el intestino del ácaro hacia la cavidad abdominal, donde se desarrolla y se transforma en cisticercoide (Fig. 5).

Dependiendo de la temperatura ambiental, este proceso puede tardar alrededor de dos a seis meses (Stunkard, 1938; Bashkirova, 1941; Borchert, 1981; Gasser *et al.*, 2005) (Fig. 7).

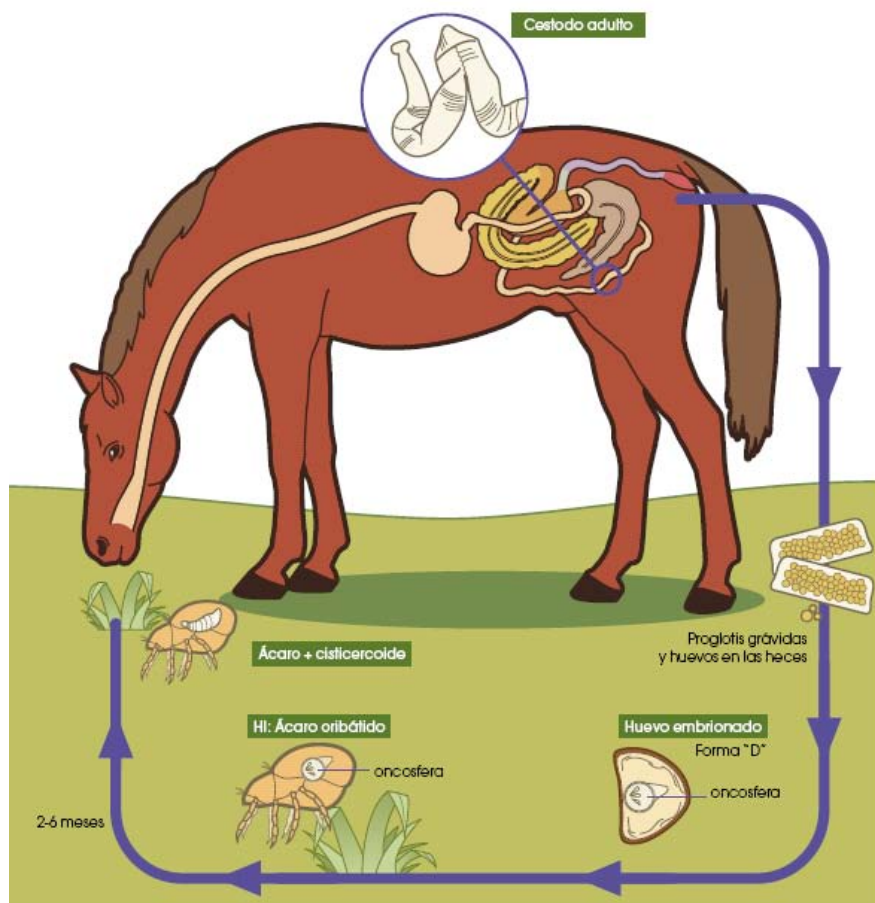


Figura 7. Ciclo biológico de cestodos anoplocefálicos de los équidos.
© 2010 Grupo Asís Biomedica S.L.

En climas templados, la ingesta de huevos por parte de los ácaros se produce en primavera-verano cuando éstos salen de su letargo invernal y las condiciones ambientales como la humedad del suelo (Tsiafouli *et al.*, 2005) y climáticas (Höglund *et al.*, 1998; Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999; Meana *et al.*, 2005) son adecuadas. Estos huevos sobreviven a temperaturas de congelación moderadas durante más de tres meses; este hecho corrobora la dinámica estacional detectada para *A. perfoliata* en el hospedador definitivo, dado que durante los meses de final de invierno y principios de primavera, estas formas parásitas deben soportar bajas temperaturas (Fernández Pato, 2013).

Los équidos se infectan de forma accidental con estos ácaros de vida libre portadores de cisticercoides al consumir pastos frescos y húmedos; los únicos estudios de caracterización epidemiológica realizados en España (Meana *et al.*, 2005) y en Suecia (Höglund *et al.*, 1998) indican un ciclo más o menos anual de la infección, en el que, normalmente, los cisticercoides que se encuentran en la cavidad corporal de los ácaros son ingeridos por los équidos desde mediados o finales de verano. En el intestino de los hospedadores definitivos esta larva cisticercoide se transforma en adulto y se desarrolla adhiriéndose a la mucosa intestinal gracias a las potentes ventosas que posee. A los dos/cuatro meses tras la infección, los cestodos adultos se reproducen y comienza la patencia (Sengbusch, 1977; Williamson *et al.*, 1997; Beelitz y Gothe, 2001; Bowman, 2003).

3.5. Epidemiología de las cestodosis equinas

Hasta el año 2002, *A. perfoliata* era el único cestodo descrito en la Península Ibérica (España y Portugal). De las otras especies de *Anoplocephala* que parasitan a los equinos domésticos, *A. magna* no había sido denunciada y *A. mamillana*, un cestodo pequeño también descrito en perisodáctilos, sólo lo había sido un par de veces en España, con una mención de su presencia en el Índice Catálogo de Zooparásitos Ibéricos de origen desconocido (Cordero del Campillo *et al.*, 1994) y aislado en cuatro animales en Alemania (Rehbein *et al.*, 2013). En un estudio llevado a cabo entre los años 2001 y 2004 con 372 equinos sacrificados en mataderos del norte y el centro de España, se ha comprobado que el 24% de los animales estaban infectados con *A. perfoliata*, el 18% con *A. magna* y el 11% con infecciones mixtas, con la particularidad de que cada una de las *Anoplocephala* spp. mostró un patrón estacional diferente (Meana *et al.*, 2005).

Estas diferencias y variaciones descritas en la prevalencia de las infecciones por *A. perfoliata* en équidos se asocian principalmente a las diferencias ambientales, tanto regionales como locales (Höglund *et al.*, 1998; Meana *et al.*, 2005), revelando una mayor prevalencia de la parasitosis en zonas con humedad elevada y constante durante todo el año (Bain y Kelly, 1977), mientras que en zonas con marcada estacionalidad, la prevalencia es menor (Slocombe, 1979).

La relación entre infecciones por *A. perfoliata* y la presentación de problemas entéricos hace necesario el conocimiento de las particularidades biológicas y epidemiológicas de las infecciones producidas por esta especie, de la misma manera que ocurre en otros helmintos de importancia en patología animal, ya que el escaso o incompleto conocimiento de la epidemiología puede conducir a tratamientos deficientes, ineficaces y, sobre todo, costosos (Meana *et al.*, 1998). Por otra parte, es muy importante conocer los diversos factores de riesgo asociados a la infección, como la temperatura ambiental, las condiciones del suelo, la estacionalidad, el manejo de los caballos, la exposición y la presencia de los hospedadores.

A pesar de ello, continúan siendo escasos los estudios que documenten los patrones epidemiológicos generales de la parasitación por cestodos, principalmente por *A. perfoliata*, en muchas zonas geográficas del mundo donde existe una población alta de equinos. Incluso los datos existentes sobre la prevalencia de infección por *A. perfoliata* muestran un rango muy amplio de variación, desde un 0,4 a un 82%, dependiente en gran medida del método diagnóstico empleado y de la ubicación geográfica del estudio (Bain y Kelly, 1977; Sotiraki *et al.*, 1997; Gasser *et al.*, 2005; Slocombe *et al.*, 2007).

3.6. Patología de las cestodosis equinas

Como ocurre con muchas otras helmintosis, la mayoría de las infecciones por cestodos en los équidos son asintomáticas, aunque a medida que la intensidad de la población del parásito aumenta por su acumulación, aumenta el grado de lesión de la mucosa intestinal, tal como ha sido ampliamente documentado en el caso de *A. perfoliata* (Pearson *et al.*, 1993; Fogarty *et al.*, 1994; Höglund *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997; Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999).

3.6.1. Patología de la infección por *A. perfoliata*

La infección por *A. perfoliata* se ha asociado con diversos trastornos intestinales, como enteritis (Tennant, 1972), rotura de ciego (Ryu *et al.*, 2001), perforación del ciego causante de peritonitis (Barclay *et al.*, 1982; Beroza, 1986;

Mezerova *et al.*, 2007), invaginación ceco-colica (Tennant, 1972; Barclay *et al.*, 1982; Beroza, 1986; Edwards, 1986; Owen *et al.*, 1989; Mezerova *et al.*, 2007) o cuadros clínicos caracterizados por enteritis, intususcepción y obstrucción intestinal en los équidos (Proudman *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2004; Gasser *et al.*, 2005).

Las principales lesiones producidas por este cestodo han sido revisadas por Gasser *et al.*, 2005). Macroscópicamente, la lesión más frecuentemente denunciada ha sido la ulceración de la mucosa de la válvula íleo-cecal (Bain y Kelly, 1977; Edwards, 1986; Pearson *et al.*, 1993; Fogarti *et al.*, 1994, Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999), frecuentemente asociada a la formación de pseudomembranas (Bain y Kelly, 1977; Fogarti *et al.*, 1994; Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999), así como al edema, la congestión y el engrosamiento de la mucosa de la válvula íleo-cecal (Edwards, 1986; Pearson *et al.*, 1993; Fogarti *et al.*, 1994, Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999) (Fig. 8).

Microscópicamente, los hallazgos más denunciados en infecciones por *A. perfoliata* han sido la ulceración de la válvula íleo-cecal, y el recubrimiento frecuente del área ulcerada por una membrana difteroide compuesta principalmente de fibrina y de infiltración eosinofílica (Bain y Kelly, 1977; Pearson *et al.*, 1993; Fogarti *et al.*, 1994, Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999).



Figura 8. Parasitación por *A. perfoliata*. Válvula ileocecal congestiva y edematosa, con ulceraciones y depósitos de pseudomembranas.

Este cestodo ha sido vinculado en los últimos años como agente causal en la presentación de cólicos (Proudman y Edwards, 1993; Proudman *et al.*, 1998; Proudman y Trees, 1999; Matthews *et al.*, 2004; Gasser *et al.*, 2005; Mezerova *et al.*, 2007), habiéndose considerado su presencia como un factor de riesgo en cuadros de impactación ileal y cólico espasmódico, sobre todo en caballos con una elevada parasitación (Slocombe, 1979; Carmel, 1988; Proudman y Edwards, 1993; Tinker *et al.*, 1997a, b; Proudman *et al.*, 1998; Traub-Dargatz *et al.*, 2001).

La relación entre la presencia de *A. perfoliata* y el desarrollo de enfermedad ha sido revisada por Nielsen (2015). Varios estudios de casos y controles basados en la detección coprológica de huevos o en el serodiagnóstico por ELISA han detectado una asociación significativa entre la presencia de *A. perfoliata* y el cólico equino (Proudman y Edwards, 1993; Proudman *et al.*, 1998; Proudman y Holdstock, 2000; Boswinkel y van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 2007). En otros casos, o bien se ha encontrado relación por diagnóstico coprológico, pero no por diagnóstico inmunológico (Back *et al.*, 2013) o no se ha podido hallar tal relación por ambos diagnósticos (Trotz-Williams *et al.*, 2008). En opinión de Nielsen (2015), *A. perfoliata* está ligado fundamentalmente al cólico íleo-cecal y no a otros tipos de cólico, razón por la cual a medida que aumenta el espectro de cólicos de otro origen disminuye la asociación con el parásito. Por último, en otro tipo de estudios, varios autores han asociado el tratamiento con pirantel (antihelmíntico de efecto cestodicida demostrado, ver apartado 2.8) con una menor incidencia de cólicos en explotaciones equinas con historial de tratamientos con ivermectina, de acción nematocida pero no cestodicida (Reeves *et al.*, 1996; Little y Blikslager, 2002), lo cual sugiere que la menor incidencia de cólicos podría deberse a la reducción de las cargas de cestodos en los animales.

3.6.2. Patología de otras cestodosis equinas

Anoplocephala magna es un cestodo que parasita las secciones anteriores del intestino delgado de los equinos; hay pocas referencias disponibles sobre su posible patogenicidad y las escasas denuncias de su presencia en cuadros clínicos van asociadas a infecciones masivas (Oliver *et al.*, 1977; Faleiros *et al.*, 2000).

Anoplocephaloides mamillana por su parte, parasita el intestino delgado de los équidos. Hasta el momento, no hay ninguna denuncia de cuadro clínico o lesiones relacionadas con su presencia.

3.7. Diagnóstico de las cestodosis equinas

Como ocurre con otras especies parásitas bien conocidas, el examen parasitológico del tracto gastrointestinal completo, por necropsia, sigue siendo el mejor método de comprobación, ya que no se dispone de otra forma de determinar y, a su vez, cuantificar la presencia de los parásitos (Agneessens *et al.*, 2001; Benito *et al.*, 2006).

En cuanto al diagnóstico *in vivo*, entre las técnicas que se han desarrollado cabe mencionar las siguientes:

- Técnicas coprológicas basadas en centrifugación y flotación con distintos protocolos y soluciones de diferente densidad (Beroza, 1986; Proudman y Edwards, 1992; Nilsson *et al.*, 1995; Meana *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1998; Proudman y Trees, 1999; Rehbein *et al.*, 2011).
- Detección de anticuerpos específicos del parásito en suero (Höglund *et al.*, 1995; Proudman y Trees, 1996a, b).
- Detección de antígenos del parásito en heces (Kania y Reinemeyer, 2005; Skotarek *et al.*, 2010).
- Amplificación de fragmentos de ADN específico del *A. perfoliata* en las heces mediante PCR (Drogemuller *et al.*, 2004; Traversa *et al.*, 2008).

Hay diversas publicaciones que hacen un análisis crítico de las ventajas e inconvenientes de cada método en relación con la sensibilidad, la especificidad y la eficacia comparada de los mismos (Gasser *et al.*, 2005; Kjaer *et al.*, 2007; Traversa *et al.*, 2008; Skotarek *et al.*, 2010). En cualquier caso, todos los métodos de diagnóstico disponibles han sido diseñados asumiendo que *A. perfoliata* es el único cestodo de importancia en los caballos domésticos en las diferentes zonas del mundo. Sin embargo, esta hipótesis puede que no sea válida para muchas otras zonas geográficas, como es el caso de algunos países, como España, donde la

presencia frecuente de *A. magna* en équidos (prevalencia de 18% en infección pura y 11% en infección mixta con *A. perfoliata*) está confirmada (Meana *et al.*, 2005), o los Estados Unidos donde se ha considerado que la infección por *A. magna* era muy frecuente (Lichtenfels, 1975) aunque con posterioridad se ha señalado *A. perfoliata* como la más prevalente (Chapman *et al.*, 2002). Por sus diferentes repercusiones patológicas, la identificación específica de ambos cestodos es un paso necesario para conocer la implicación real de las cestodosis dentro del diagnóstico etiológico del cólico, y conocer la epidemiología real de la enfermedad. En países como Estados Unidos se ha estimado la incidencia de cólicos en un 4,2% anual y, de éstos, un 11% suele ser mortal (Traub-Dargatz *et al.*, 2001). En el contexto de las cestodosis, existen en el mercado suficientes productos cestodicidas eficaces para, aplicados en épocas adecuadas, prevenir el desarrollo de cuadros clínicos o, en su caso, evitar la pérdida de valiosos animales por diagnósticos erróneos.

3.7.1. Diagnóstico coprológico

Uno de los factores que indudablemente contribuye a las variaciones en el resultado del diagnóstico de las cestodosis es la escasa fiabilidad y la dificultad de los métodos de detección, principalmente de los huevos por coprología, lo que suele suceder también con muchas otras parasitosis de interés veterinario (Ward *et al.*, 1997; Cringoli *et al.*, 2004), de manera que *A. perfoliata* no es una excepción (Agneessens *et al.*, 1998; Meana *et al.*, 1998; Beelitz y Gothe, 2001; Trotz-Williams *et al.*, 2008).

El diagnóstico de cestodosis por coprología se basa en el examen de las heces de caballos en busca de huevos del cestodo. Para su detección se han utilizado diversas técnicas, como la sedimentación simple, la flotación directa con soluciones densas, o combinando la sedimentación (ya sea por gravedad o centrifugación forzada) con la flotación con soluciones densas. Las principales modificaciones a la técnica inicial, descrita por Beroza *et al.* (1986), son la incorporación de un mayor volumen de líquido para homogenizar las heces, un tamiz de mayor diámetro y un proceso de sedimentación ausente en la técnica inicial, si bien, todas estas modificaciones requieren de prolongados tiempos de espera (French *et al.*, 1994). Para el recuento de las formas parasitarias se puede

utilizar al cámara de McMaster o la técnica recientemente descrita de FLOTAC (Cringoli *et al.*, 2010).

La sensibilidad de las técnicas coprológicas es bastante variable, oscilando entre un 23% (Nilsson *et al.*, 1995) y un máximo de un 72% (Rehbein *et al.*, 2011), por lo que los únicos datos precisos del diagnóstico de la infección se han basado en el recuento de los cestodos hallados por necropsia. Así, en estudios realizados en Suecia, de un total de 470 animales muestreados por necropsia, el 65% fueron positivos a la infección, pero de éstos solo un 23% fue positivo por coprología utilizando una centrifugación con flotación, en una solución densa, mezcla de Clna y sacarosa (Nilsson *et al.*, 1995). En un estudio posterior en España en el que se analizaron 107 équidos, se confirmó por necropsia una prevalencia del 22%, de los cuales fueron positivos por coprología el 54% mediante una técnica de sedimentación y flotación con solución densa de sulfato de zinc y sacarosa (Meana *et al.*, 1998). Otros estudios realizados en Reino Unido y Canadá, utilizando igualmente una combinación de sedimentación y flotación con solución saturada de sacarosa, mostraron una sensibilidad del 61% (Proudman y Edwards, 1992), y del 62% (Slocombe, 2004). Estas técnicas de flotación – sedimentación logran una sensibilidad mucho mayor que la flotación simple (Tomczuk *et al.*, 2014). Por último, la técnica de doble centrifugación- flotación utilizando 15 g de heces y una solución concentrada de sacarosa para flotación parece ofrecer una ventaja adicional para la detección de huevos de *Anoplocephala* en las heces de caballo, puesto que la sensibilidad lograda fue superior (72%), aunque estos resultados no fueron corroborados por necropsia (Rehbein *et al.*, 2011).

Pocos estudios han comparado los diferentes procedimientos descritos hasta la fecha (Beroza, 1986; French *et al.*, 1994; Beelitz y Gothe, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2005; Rehbein *et al.*, 2011; Tomczuk *et al.*, 2014), aunque algunos de ellos evaluaron sus resultados mediante análisis estadístico (Meana *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2003).

Pero además de las diferencias inherentes a la técnica utilizada, otros factores pueden contribuir a la variable sensibilidad de la coprología, como el estado de madurez de los cestodos o el grado de parasitación. En relación con la carga parasitaria, son varios los autores que han reseñado un incremento en la

sensibilidad de la técnica de sedimentación/flotación hasta el 89% (Kjaer *et al.*, 2007) o el 92% (Proudman y Edwards, 1992) en muestras de caballos parasitados con más de 20 cestodos.

En cuanto a la especificidad de la coprología, la identificación de los huevos de anoplocefálicos es relativamente sencilla por su morfología característica ya mencionada, fácilmente distinguible de los de otros helmintos. Sin embargo, la distinción entre los huevos de *A. perfoliata* y *A. magna* es difícil, dada su similitud morfológica. La información sobre el diámetro de la cubierta del huevo es coincidente en *A. perfoliata* (65-80 μm) (revisado por Soulsby, 1987; French y Chapman, 1992; Tarazona Vilas, 1999; Gasser *et al.*, 2005), pero no en *A. magna*. Según diferentes revisiones, los huevos de *A. magna* son, o bien menores (50-60 μm ; Soulsby, 1987), o bien mayores (70-80 μm ; Tarazona Vilas, 1999) que los de *A. perfoliata*, y en cuanto a la oncosfera, la escasa información indica un diámetro mayor en *A. perfoliata* (16 μm) que en *A. magna* (8 μm) (Tarazona Vilas, 1999).

Por ello, aunque el diagnóstico coprológico de las cestodosis equinas se ha optimizado en lo posible en lo que a sensibilidad respecta, la dificultad en la distinción entre los huevos de *Anoplocephala* spp. ha supuesto una nueva limitación en áreas donde coexisten las dos especies.

3.7.2. Diagnóstico inmunológico

El desarrollo de diversas técnicas inmunológicas ha contribuido de forma marcada a resolver algunos problemas de sensibilidad en el diagnóstico de las cestodosis equinas (Höglund *et al.*, 1995; Proudman y Trees, 1996a,b; Maddox-Hyttel *et al.*, 2005; Kjaer *et al.*, 2007; Skotarek *et al.*, 2010).

Los primeros intentos se realizaron con un antígeno somático crudo de *A. perfoliata*, obtenido de su escólex y empleado en la detección de anticuerpos IgG séricos mediante la técnica de ELISA en équidos con cargas parasitarias y lesiones evaluadas por necropsia, pero las variaciones en los niveles de anticuerpos detectados ante parasitaciones similares indicaban la poca fiabilidad del método en el diagnóstico individual, aunque los autores observaron una fuerte correlación entre los niveles de anticuerpos específicos, la carga parasitaria y el grado de

lesión; en cuanto a la especificidad del antígeno, no detectaron reactividad aparente frente a sueros de caballos parasitados con nematodos estrangilados (Höglund *et al.*, 1995). Es de destacar que dichos autores detectaron un patrón estacional en los niveles de anticuerpos detectados, con una elevación temporal en el mes de junio, que relacionaron con el establecimiento de una infección reciente.

Posteriormente, Proudman y Trees (1996a) compararon el uso del antígeno somático crudo con el de un extracto crudo de excreción/secreción (E/S) para la detección específica de anticuerpos séricos frente a *A. perfoliata* por ELISA, determinando que el antígeno E/S permitía una mayor distinción entre caballos parasitados y no parasitados por dicho cestodo, con un 68% de sensibilidad y un 95% de especificidad, si bien con dicho antígeno crudo detectaron reactividad cruzada en seis de diez sueros de caballos parasitados con otros helmintos no cestodos. Por inmunoelectrotransferencia (immunoblot), determinaron que el reconocimiento específico residía en los componentes de 12/13 kDa de dicho antígeno E/S.

En un trabajo posterior los mismos autores purificaron por afinidad dicha fracción de 12/13 kDa y evaluaron su uso mediante ELISA en la detección específica en caballos con infección controlada de *A. perfoliata* (Proudman y Trees, 1996b). Dichos autores observaron una correlación positiva entre la detección de anticuerpos específicos del tipo IgG y, sobre todo, IgG (T) y la intensidad de infección. Por inmunoblot no se detectó reactividad al enfrentar los sueros positivos frente a *A. perfoliata* con antígenos procedentes de otros helmintos (estrongílidos, *Echinococcus granulosus*, *Taenia multiceps*), sugiriendo así que la respuesta frente a la fracción de 12/13 kDa del antígeno E/S de *A. perfoliata* era específica y concluyendo que el ELISA para la detección de IgG (T) específicas frente a dicho antígeno era una herramienta diagnóstica de utilidad y en la actualidad dicho ELISA está disponible comercialmente.

Diferentes estudios han evaluado con posterioridad la utilidad diagnóstica de dicho ELISA con antígeno E/S de 12-13 kDa. A diferencia de Proudman y Trees (1996b), varios autores no han hallado correlación entre los niveles de anticuerpos detectados y la intensidad de parasitación (Kjaer *et al.*, 2007; Skotarek *et al.*, 2010), aunque algunos han establecido un punto de corte de densidad óptica con utilidad

diagnóstica para determinar qué caballos deben ser tratados frente a *A. perfoliata* (Kjaer *et al.*, 2007). En este sentido, varios autores han investigado con dicho ELISA la posible correlación entre cólico y seropositividad frente a *A. perfoliata*. En un estudio de casos y controles llevado a cabo en Gran Bretaña, Proudman y Edwards (1998) hallaron una asociación positiva entre los niveles de IgG (T) detectados por ELISA frente a *A. perfoliata* y el riesgo de cólico espasmódico. En un estudio similar llevado a cabo en Holanda, Boswinkel y van Oldruitenborgh-Oosterbaan (2007) detectaron una media de densidades ópticas significativamente mayor en los caballos con cólico que en los controles. Por el contrario, en otro estudio llevado a cabo en Canadá no se pudo hallar una asociación estadísticamente significativa entre seropositividad frente a *A. perfoliata* y riesgo de cólico (Trotz-Williams *et al.*, 2008).

Con posterioridad, con la utilización del mismo antígeno E/S DE 12/13 kDa, se han realizado intentos de desarrollar un ELISA de detección de IgE, tanto en mucosa cecal como en suero aunque, si bien se detectaron anticuerpos IgE específicos en el sobrenadante de raspados de mucosa de équidos parasitados por *A. perfoliata*, la respuesta sérica de IgE fue bastante inferior a la del ELISA basado en la detección de IgG (T) (Pittaway *et al.*, 2014).

A pesar de la utilidad del diagnóstico serológico en la detección de animales que han elaborado anticuerpos frente al parásito, el ELISA anti-12/13 kDa tiene limitaciones, particularmente su falta de especificidad (falsos positivos) y sensibilidad (falsos negativos) en casos de cambios recientes en el estatus parasitológico del animal, por ejemplo, como consecuencia de desparasitaciones o de infecciones recientes. Entre los factores que se han señalado capaces de alterar la sensibilidad de los test serológicos están la variabilidad en la respuesta inmunitaria individual y los tratamientos antihelmínticos previos (Hoglund *et al.*, 1995; Proudman y Trees, 1996a; Traversa *et al.*, 2008).

Para paliar problemas similares detectados con otros test serológicos, diferentes autores han elaborado ELISAs de captura para la detección de coproantígenos de diversos parásitos de los animales domésticos y útiles, como por ejemplo *E. granulosus* (Craig *et al.*, 1995; Casaravilla *et al.*, 2005) o *Fasciola hepatica* (Mezo *et al.*, 2004). En esa misma línea, con el fin de detectar la infección

por *A. perfoliata* en tiempo real, se ha diseñado un ELISA de captura para la detección de antígenos en heces de caballos, concretamente de la fracción de 12/13 kDa del antígeno E/S de *A. perfoliata*, con resultados prometedores (Kania y Reinemeyer, 2005). Con posterioridad, con la utilización de dicho ELISA se ha demostrado que existe una correlación positiva entre los niveles de antígeno de 12-13 kDa de *A. perfoliata* y la intensidad de parasitación (Skotarek *et al.*, 2010).

En resumen, los métodos de inmunodiagnóstico diseñados para la detección de *A. perfoliata*, se han desarrollado, o bien a partir del antígeno somático obtenido del escólex (Hoglund *et al.*, 1995), o bien del antígeno E/S de 12-13 kDa de *A. perfoliata* (Proudman y Trees, 1996a, b). La especificidad del antígeno obtenido de escólex se basó en la ausencia de reactividad cruzada con antígenos de nematodos estrongilados (Hoglund *et al.*, 1995), y la del antígeno E/S de 12-13 kDa, en la falta de reactividad frente a sueros de caballos parasitados con *A. mamillana*, nematodos estrongilados y *Parascaris equorum* (Proudman y Trees, 1996a), y en la ausencia de reactividad cruzada con antígenos procedentes de otros helmintos (estrongílidos, *Echinococcus granulosus*, *Taenia multiceps*) (Proudman y Trees, 1996b). No obstante, según se deduce de las publicaciones sobre el particular, ninguno de los dos antígenos ha sido probado con posterioridad frente a sueros de caballos positivos a *A. magna*, por lo que se desconoce la especificidad real de los métodos actuales de inmunodiagnóstico en la distinción entre las dos especies de *Anoplocephala*.

3.7.3. Diagnóstico molecular

Paralelamente al desarrollo del ELISA de coproantígeno y con la misma finalidad de resolver las limitaciones e inconvenientes de las técnicas de diagnóstico convencionales, otros estudios se han centrado en el desarrollo de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como método alternativo de diagnóstico. Los espaciadores de transcripción interna ITS (Internal transcribed spacer), secuencias del ADN ribosomal (ADNr), se han popularizado en la investigación de las variaciones tanto inter- como intraespecíficas en diferentes grupos de parásitos, entre ellos, de cestodos, debido al elevado nivel de heterogeneidad de sus nucleótidos (Bowles *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997;

Verneau *et al.*, 1997; Van Herwerden *et al.*, 2000; Zehnder and de Chambrier, 2000; Drogemuller *et al.*, 2004). Los buenos resultados logrados en la amplificación del ADN especie-específico de algunos nematodos estrongilados en heces de équidos han validado esta técnica y su potencial diagnóstico en la detección de dichos parásitos (Hung *et al.*, 1999).

En el diagnóstico de las infecciones por cestodos en équidos, Drogemuller *et al.* (2004) secuenciaron varios fragmentos de ADNr de *A. perfoliata* y de *A. mamillana* y demostraron que el ITS-2 del ADN ribosomal contenía marcadores genéticos específicos de ambos parásitos, y a partir de dos cebadores basados en dicha secuencia desarrollaron una PCR anidada para la detección específica de ADN del parásito en muestras fecales de équidos. Dichos autores verificaron la validez de dicha técnica contaminando artificialmente muestras fecales con fragmentos del cestodo, llegando a detectar un fragmento de 0,6 mg en 0,5 y 1 g de heces. La fiabilidad de este método fue posteriormente demostrada en caballos con infección natural, en comparación con los métodos coprológico y serológico, así como su utilidad en la verificación de ausencia de ADN parasitario en heces de caballos tratados con un cestodicida (Traversa *et al.*, 2008). No obstante, por tratarse de una técnica de diagnóstico cualitativa, no permite estimar la carga parasitaria, y por tanto, la interpretación del estado clínico de los animales parasitados, a diferencia de los métodos serológicos (Traversa *et al.*, 2008).

Son escasos los estudios que han comparado las técnicas de diagnóstico actuales por su sensibilidad y especificidad en la detección y menos aún determinación de la intensidad, de la parasitación por *A. perfoliata*. Dos estudios realizados con caballos con intensidades parasitarias conocidas por necropsia compararon, o bien el diagnóstico coprológico con el serológico (Kjaer *et al.*, 2007), o bien los diagnósticos coprológico, serológico y detección de coproantígeno (Stokarek *et al.*, 2010), sin evaluar en ambos casos el diagnóstico molecular. En la comparación realizada por Traversa *et al.*, (2008), anteriormente mencionada, se evaluaron los diagnósticos coprológico, serológico y molecular, indicando las ventajas de este último en el diagnóstico de *A. perfoliata*, pero se trabajó con animales con cargas parasitarias desconocidas.

La especificidad de la PCR en la detección de *A. perfoliata* ha sido contrastada frente a *A. mamillana* y diversas especies de nematodos de la subfamilia Cyatostominae (Drogemuller *et al.*, 2004), así como frente a diversos nematodos (*Oxyuris equi*, Cyathostominae, *Habronema* spp.) y larvas de *Gasterophilus* spp. (Traversa *et al.*, 2008). Sin embargo, los cebadores diseñados para la amplificación específica de *A. perfoliata* no han sido ensayados con *A. magna*, por lo que, como ocurre con el inmunodiagnóstico, se desconoce su especificidad real en la distinción entre las dos especies de *Anoplocephala* presentes en España.

3.7.4. Diagnóstico post-mortem

El diagnóstico post mortem realizado en las salas de necropsia es fácil pero requiere infraestructura, tiempo y un gran esfuerzo físico debido a la gran longitud del paquete digestivo, que debe ser manipulado y analizado en su totalidad.

Como se ha indicado, la localización preferente de *A. perfoliata* es el ciego, en las proximidades de la válvula íleo-cecal y, en ocasiones, la parte final del íleon (Borchert, 1981; Soulsby, 1987). Por su parte, *A. magna* se localiza sobre todo en las primeras porciones del intestino delgado, pero en ocasiones se ha encontrado en el estómago (Borchert, 1981; Soulsby, 1987), al igual que *A. mamillana* (Borchert, 1981; French y Chapman, 1992; Tarazona Vilas, 1999).

3.8. Tratamiento de las cestodosis equinas

No todos los antihelmínticos de uso común en équidos son eficaces frente a los cestodos. Así, antihelmínticos clave como el oxfendazol, la moxidectina y la ivermectina son ineficaces frente a *A. perfoliata* (Kingsbury y Reid, 1981; Monahan *et al.*, 1996).

Entre los productos que han mostrado eficacia cestodocida en équidos están el diclorofeno (180 mg/kg), la niclosamida (100 mg/kg) y el tartrato de morantel a dosis elevadas (p.e. 12,5 mg/kg) (ver Gasser *et al.*, 2005). El pamoato de pirantel a dosis elevadas, p.e. 13,2 mg/kg (dos veces superior a la recomendada frente a nematodos) también tiene un efecto cestodocida probado (Lyons *et al.*, 1986; Slocombe, 1979, 2004) y ha sido ampliamente usado. Con posterioridad se ha

demostrado también la eficacia del praziquantel (0,75 mg/kg – 1 mg/kg) en el tratamiento de *A. perfoliata* (Lyons *et al.*, 1992, 1995, 1998; Reinemeyer *et al.*, 2006; Slocombe, 2006). La eficacia del praziquantel a la dosis de 1 mg/kg p.v. ha sido verificada con las tres especies de cestodos (Slocombe *et al.*, 2007).

Se ha evaluado también la eficacia cestodocida del pamoato de pirantel y del praziquantel en combinación con otros productos endectocidas, por ejemplo, pamoato de pirantel/triclorfón y praziquantel/moxidectina (Grubbs *et al.*, 2003), o praziquantel/ivermectina (Coles *et al.*, 2003; Rehbein *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2003; Rehbein *et al.*, 2007) en el tratamiento de un mayor espectro de parasitosis.

En la actualidad, los productos más usados en la mayoría de los países son el praziquantel en combinación con ivermectina y el pirantel, en forma de pamoato o, como se presenta en España, embonato de pirantel, sin que se haya detectado hasta la fecha la selección de resistencias frente a ellos en ninguna de las tres especies de cestodos.

El tratamiento constituye actualmente la herramienta central en el control de las cestodosis equinas. Sin embargo, los programas de control deben diseñarse a partir de estudios epidemiológicos que indiquen las épocas de mayor riesgo de infección en los distintos países, para lo cual los métodos actuales de diagnóstico *in vivo* resultan aún insuficientes en lo que a especificidad respecta.

8. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO

Los resultados de los objetivos del diagnóstico coprológico han sido publicados bajo el título:

“Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*” (Bohórquez *et al.*, 2014. *Vet Parasitol* 204, 396-401).

4.1.1. RESUMEN:

Con el fin de evaluar la fiabilidad del diagnóstico coprológico en la detección de *A. perfoliata* en áreas donde coexiste la infección por *A. magna*, se analizó la sensibilidad del diagnóstico coprológico para cada una de las especies en caballos identificados por necropsia como positivos a *Anoplocephala* spp. en infección simple o mixta. Se analizó también la distribución de cada especie en función del sexo y de la edad de los caballos. Por último, se evaluó la fiabilidad de dos variables morfométricas (diámetro de la oncosfera y bisectriz mayor de la cubierta) en la diferenciación entre los huevos de ambas *Anoplocephala* spp.

El estudio se llevó a cabo sobre 130 équidos identificados como positivos a la infección por *Anoplocephala* spp. por inspección visual *post-mortem*, utilizados como controles positivos. De cada animal se analizaron 40 g de heces, recogidas directamente del recto, por el método de sedimentación/flotación descrito por Meana *et al.* (1998) y se calculó la sensibilidad de la coprología para cada especie. Se determinó así mismo el estado de la infección por cada *Anoplocephala* spp. en cada animal según criterios morfológicos (cestodos maduros vs inmaduros) y se calculó la sensibilidad de la coprología utilizando los équidos con infección madura como controles positivos. Por último, se investigó la presencia de huevos en los proglotis terminales de cestodos clasificados como “maduros” en un grupo de animales con baja carga parasitaria (< 30 cestodos) y se calculó de nuevo la sensibilidad de la coprología para cada especie, utilizando como controles positivos a los caballos con cestodos grávidos. Los análisis estadísticos de

sensibilidad se llevaron a cabo por el test del Chi cuadrado. La distribución de especies por sexo y edades se calculó sólo en animales con infección simple.

Por cada especie de *Anoplocephala* se recogieron huevos a partir del último anillo grávido de distintos cestodos procedentes de varios animales. Se examinaron 100 huevos de cada especie por microscopía óptica (x400) para obtener dos medidas: a) diámetro de la oncosfera; b) bisectriz mayor de la cubierta. Se calculó la sensibilidad y especificidad de cada parámetro morfométrico en la identificación de cada especie de *Anoplocephala* mediante la selección de un punto de corte para cada medida basado en la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (Noordhuizen *et al.*, 1997). Estos cálculos se realizaron mediante la opción “Threshold value of a diagnostic test” de Win Episcopo 2.0.

En cuanto a la sensibilidad de la coprología, ésta resultó significativamente más sensible ($P < 0,01$) en la detección de *A. magna* que de *A. perfoliata*, tanto en el análisis global (55% vs 26%) como en el de équidos con cestodos maduros (75% vs 15%) o grávidos (79% vs 20%) y con independencia de la carga parasitaria, puesto que predominaron las intensidades bajas (<30 cestodos) en los équidos que resultaron positivos por coprología a una u otra especie.

En relación con la distribución por edades, se detectó un claro predominio de la infección por *A. magna* en animales jóvenes (≤ 2 años) que en adultos (90% vs 10%; $P < 0,01$).

En relación con la identificación morfológica, los huevos de *A. perfoliata* mostraron mayores índices morfométricos que los de *A. magna*. El diámetro de la oncosfera fue de 15 – 25 μm ($x \pm \text{D.E.} = 17,78 \pm 1,28$) en *A. perfoliata*, frente a 10 – 17,5 μm ($x \pm \text{D.E.} = 12,21 \pm 1,34$) en *A. magna*. En el 100% de oncosferas de *A. perfoliata*, el diámetro fue $\geq 15 \mu\text{m}$, mientras que en el 97% de las de *A. magna* el diámetro fue $< 15 \mu\text{m}$. Según el análisis ROC, el umbral óptimo de distinción entre las oncosferas de ambas especies fue 15 μm . Con ese punto de corte, los huevos de *A. perfoliata* podrían distinguirse de los de *A. magna* con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97%. El área bajo la curva ROC (AUC) fue 0,99 (95% I.C.: 0,98–0,99), indicando una gran precisión en el análisis. En cuanto a la bisectriz mayor de la cubierta, en *A. perfoliata* fue 65–112, 5 μm ($x \pm \text{D.E.} = 80,63 \pm 8,14$) y en *A. magna*, 57,5 – 75 μm ($x \pm \text{D.E.} = 65,06 \pm 3,94$). En el 78% de los huevos de *A.*

perfoliata, las bisectrices fueron $\geq 70 \mu\text{m}$, mientras que en el 84% de los de *A. magna*, éstas fueron $< 70 \mu\text{m}$. Según el análisis ROC, se seleccionó en $70 \mu\text{m}$ el punto de corte óptimo para distinguir los huevos de *A. perfoliata* de los de *A. magna* con una sensibilidad de 98% y una especificidad de 84%. El área bajo la curva ROC (AUC) fue 0,97 (95% I.C.: 0,96–0,98), indicando una gran precisión en el análisis. Con estos resultados, proponemos el uso de estos dos índices morfométricos ($15 \mu\text{m}$ de diámetro de oncosfera y $70 \mu\text{m}$ de bisectriz mayor de cubierta) como puntos de corte en la distinción entre ambas especies, especialmente en équidos jóvenes, aparentemente propensos a la infección por *A. magna*, en áreas donde coexisten ambas especies.

4.1.2. Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*

Alejandro Bohórquez¹, Aránzazu Meana¹, Nélida F. Pato², Mónica Luzón^{1*}

1. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida de Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España.

2. Hospital Clínico Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad Alfonso X El Sabio, Avenida Universidad 1, Villanueva de la Cañada, 28691 Madrid, España.

* Corresponding author. Tel.: +34 3943948; fax: +34 91 3943908. E-mail address: mluzon@vet.ucm.es (M. Luzón).

Abstract

Current copro-diagnostic tests for *Anoplocephala perfoliata* show high variation in their sensitivity and given the morphological similarity of *Anoplocephala* spp. eggs, this could be related to the presence of *Anoplocephala magna* alone or co-existing with *A. perfoliata*. In the present study, coprology was significantly more sensitive ($p < 0.01$) at detecting *A. magna* than *A. perfoliata*. This difference was independent of the parasite burden and was greater when testing was limited to horses with mature or gravid tapeworms. *A. magna* infection was strongly linked to young horses (≤ 2 years). The eggs of *A. magna* are smaller. Using 15 μm and 70 μm cut-offs for oncosphere diameter and the major shell bisector length, respectively, the eggs of *A. perfoliata* were identified with 100% sensitivity, 97% specificity and 98% sensitivity, 84% specificity. The use of these two morphometric variables would therefore be useful for the copro-identification of *A. perfoliata* in countries where both species coexist.

Key words: Sensitivity; specificity; copro-diagnosis; *Anoplocephala perfoliata*; *Anoplocephala magna*; host-age distribution.

Introduction

Anoplocephala perfoliata (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae) is a common intestinal tapeworm that affects horses worldwide. Mounting evidence suggests that *A. perfoliata* is responsible for several intestinal disorders (review by Gasser *et al.*, 2005), and its accurate detection is crucial for both clinical and

epidemiological purposes. Currently available diagnostic methods are based on the assumption that *A. perfoliata* is the only epidemiologically significant tapeworm to parasitize domestic horses. However, this assumption does not hold true in countries such as USA or Spain. In USA, *Anoplocephala magna*, a cestode of limited pathogenicity, is at least as prevalent as *A. perfoliata*, (Lichtenfels, 1975). In Spain, since the first detection of *A. magna* in abattoirs in northern and central regions (Meana *et al.*, 2002), this cestode has been frequently detected throughout the country, although with different seasonality from *A. perfoliata* (Meana *et al.*, 2005).

To improve the diagnosis of *A. perfoliata* infection, several methods have been developed including the detection of parasite eggs in faeces using improved centrifugation and flotation techniques, though these methods have shown considerable variation in their sensitivity: from 40 – 62% (Gasser *et al.*, 2005) to 75% (Rebhein *et al.*, 2010). Besides differences inherent to each technique, some factors that could contribute to this variability are the intensity of infection, the irregular shedding of proglottids or the maturity state of the tapeworms, but the possibility of infection/coinfection with *A. magna*, should also be considered.

Thus, in areas where both these two *Anoplocephala* species coexist, the copro-diagnosis of equine cestodosis has been hindered because of the morphological similarity between the eggs of the two species. The information on shell diameter is scarce and applicable to *A. perfoliata* (65-80 μm , see reviews by Soulsby, 1987; Tarazona Vilas, 1999; Gasser *et al.*, 2005) but not to *A. magna*. According to different reviews, the eggs of *A. magna* are either smaller (50 – 60 μm in Soulsby, 1987) or larger (70 – 80 μm in Tarazona Vilas, 1999) than those of *A. perfoliata*. The limited data on the oncosphere indicates a larger diameter for *A. perfoliata* (16 μm) than *A. magna* (8 μm) (Tarazona Vilas, 1999).

The differences in pathogeny and ecology between both tapeworm species justify the necessity of differential diagnostic methods. In order to evaluate the reliability and accuracy of the copro-diagnosis in the detection of *A. perfoliata* in the presence of *A. magna*, the sensitivity of the copro-diagnosis of *A. perfoliata* and *A. magna* was examined in horses identified by necropsy as positive for *Anoplocephala* spp. as single or double infections. The distribution of each species according to the age and sex of the host was also examined. Finally, the reliability of two morphometric variables (major shell bisector length and oncosphere

diameter) for the identification of eggs of both *Anoplocephala* species was assessed.

Materials and Methods

1. Sensitivity of coprology as a diagnostic test

The digestive tracts of horses slaughtered in Spain were dissected and 130, classified as positive for *Anoplocephala* spp. infection by visual inspection, used as the reference standard. All cestodes recovered from each digestive tract were fixed in 70% ethanol for their identification and recording of tapeworm burdens. Faeces were taken directly from the rectum of each infected animal and 40 g analyzed by the sedimentation/flotation method described by Meana *et al.* (1998) to detect *Anoplocephala* spp. eggs. The sensitivity of coprology as a diagnostic test was then calculated for each *Anoplocephala* species.

The stage of infection of each horse was also established according to morphological criteria. For *A. perfoliata*, tapeworms were classified as “immature” (lancet-shaped) versus “mature” (triangular-shaped) according to Schuster (1991). For *A. magna*, small (< 9 cm long) uniformly shaped tapeworms were defined as “immature” as compared to longer “mature” tapeworms with wider, mostly darker, terminal segments. The sensitivity of coprology as a diagnostic test was also calculated for each species using the horses with mature tapeworms as the reference standard.

The presence of eggs in terminal proglottids of tapeworms classified as “mature” was investigated in a group of horses with a low parasite burden (< 30 tapeworms). The sensitivity of coprology was also calculated for each species using the horses with gravid tapeworms as the reference standard. Statistical analyses of sensitivities were performed by the Chi squared test.

2. Host distribution of species

Of the 130 animals selected as positive for *Anoplocephala* spp., only 94 animals could be identified by sex (45 males and 49 females) and age (66 young, i.e. ≤ 2-years-old, and 28 adults, i.e. >2-years-old) as the slaughterhouses records were not always accessible. Of these, animals with a single infection (n = 43 *A.*

perfoliata and $n = 29$ *A. magna*) were selected to establish the distribution of species according to host age or sex.

3. Egg morphology

Anoplocephala eggs were collected from about 10 specimens of each *Anoplocephala* spp., in both cases coming from more than two animals, in order to increase the quality of the samples representation. The last gravid segment of each tapeworm was sectioned across the rear transverse line with a scalpel, and the eggs collected by shaking the sectioned segments inside Eppendorf® tubes (volume 1.5 ml) filled with tap water. For each species, the contents collected from different tapeworms were mixed together.

Under a light microscope (Nikon), 100 eggs of each species were examined at a magnification of x400 to obtain two measurements: a) the diameter of the oncosphere, and b) the length of the major shell bisector (Figure 1). The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of each morphometric character to identify each *Anoplocephala* species were calculated by selecting an optimal cut-off for each measurement based on the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve (Noordhuizen *et al.*, 1997). Briefly, the ROC curve displays the relationship between the true positive fraction (Se) and the false positive fraction ($1-Sp$) over the range of possible cut-off values. In the ROC analysis, the optimal cut-off value is that with “sensitivity plus specificity” ($Se + Sp$) at a maximum. The area under the ROC curve (AUC) is a measurement of the validity of the analysis, with a value of 1 representing the perfect analysis. These calculations were carried out using the “Threshold value of a diagnostic test” option of Win Episcopo 2.0.

Results

1. Sensitivity of coprology as a diagnostic test

Tapeworm burdens, infecting parasites and coprological results are provided in Table 1. Sixty four animals harboured *A. perfoliata* and 35 animals harboured *A. magna* as a single infection, while 35 animals harboured both *Anoplocephala* spp. infections. Tapeworm burdens were mostly low (1-30 tapeworms) for both species (68% *A. perfoliata* and 89% *A. magna*). High *A. perfoliata* burdens (> 100 tapeworms) were in the ranges 115 – 396 in single

infections and 138 – 1,113 in double infections, whereas *A. magna* burdens were 130 – 170 in double infections. The diagnostic sensitivities of coprology were 11% and 51% respectively for *A. perfoliata* and *A. magna* in single infections and 58% in double infections. Considering single and double infections together, sensitivities were 26% for *A. perfoliata* and 55% for *A. magna*. Statistical analysis indicated a significantly higher ($p < 0.01$) sensitivity to detect *A. magna* than *A. perfoliata* when comparing both single and single plus double infections. For both species, low tapeworm burdens predominated over moderate (31 – 100 tapeworms) or high burdens in animals returning a positive coprology test.

As shown in Table 2, in the subset of horses with mature tapeworms, sensitivity was significantly lower ($p < 0.01$) in animals parasitized with *A. perfoliata* (15%) than with *A. magna* (75%). Similar results were obtained in animals harbouring gravid tapeworms (20% vs 79%, $p < 0.01$).

2. Host distribution of species

The presence of *A. magna* as a single infection ($n = 29$) was significantly associated ($p < 0.01$) with host age (90% young, $n = 26$ vs 10% adults, $n = 3$). These results differed significantly ($p < 0.01$) from those recorded for single *A. perfoliata* infections ($n = 43$) (53% foals, $n = 23$ vs 47% adults, $n = 20$) in which no age association was observed. Only three adult females harboured *A. magna* as a single infection; of them, one was a pregnant mare at the time of necropsy and other mare had foaled six months earlier. No host sex predilection was observed of either species (*A. perfoliata*: 40% males, $n = 17$ vs 60% females, $n = 26$; *A. magna*: 52% males, $n = 15$ vs 48% females, $n = 14$).

Of the subset of animals showing *A. magna* as a double infection (22 animals that were excluded from the host distribution analysis), five were adults (3 females and 2 males).

3. Identification according to egg morphology

3.a. Oncosphere diameter (Figure 1, a)

As shown in Table 3, the oncosphere diameter of the *A. perfoliata* eggs examined ranged from 15 to 25 μm (mean \pm SD 17.78 ± 1.28), with a mode of 17.5 μm (84% of *A. perfoliata* eggs). For *A. magna* eggs, oncosphere diameters were 10

to 17.5 μm (mean \pm SD 12.21 \pm 1.34), with a mode of 12.5 μm (44% of *A. magna* eggs). In 100% of *A. perfoliata* eggs, oncospheres were $\geq 15 \mu\text{m}$ whereas in 97% of *A. magna* eggs they were $< 15 \mu\text{m}$. According to the ROC analysis, the optimal threshold to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs was a diameter of 15 μm . Using this cut-off, eggs of *A. perfoliata* would be distinguished from *A. magna* with a sensitivity of 100% and specificity of 97% (Figure 2). The AUC was 0.99 (95% C.I.: 0.98 – 0.99), indicating high accuracy.

3.b. Major shell bisector length (Figure 1, b)

As shown in Table 3, the *A. perfoliata* egg shell's major bisector was 65 – 112.5 μm long (mean \pm SD 80.63 \pm 8.14) with values in the range 77.5 – 85 μm showing highest frequencies (58% of the eggs). Lengths for *A. magna* ranged from 57.5 to 75 μm (mean \pm SD 65.06 \pm 3.94), and the highest frequency range was 62.5 – 67.5 μm (52% of the eggs). In 98% of *A. perfoliata* eggs, shell bisectors were $\geq 70 \mu\text{m}$, whereas in 84% of *A. magna* eggs they were $< 70 \mu\text{m}$. According to the ROC analysis, 70 μm was selected as the optimal cut-off bisector length to distinguish between the eggs of *A. perfoliata* and *A. magna* with a sensitivity of 98% and specificity of 84% (Figure 3). The AUC was 0.97 (95% C.I.: 0.96 – 0.98), indicating high accuracy.

Discussion

This study reveals that as a diagnostic test, coprology is significantly more sensitive to detect *A. magna* than *A. perfoliata*. This difference was independent of the tapeworm burden since low burdens of both *Anoplocephala* spp. were predominant in animals testing positive by coprology. The higher sensitivity of the test observed here for *A. magna* over *A. perfoliata* was even more evident in horses parasitized with mature or gravid tapeworms. Using this sample, any possible biases due to an immature tapeworm stage were ruled out. The most likely explanation for it is the larger size of *A. magna*, whose long strobila is made up of wide segments that break-off in groups when gravid. In contrast, *A. perfoliata* is much smaller and its gravid proglottids form and break away at a much slower rate. Another finding of this study was the preference shown by *A. magna* for young (≤ 2 years) horses. Thus, 90% of single infections by *A. magna* were

detected in young animals. Only three adult females were parasitized by *A. magna* as a single infection, one of them being pregnant and other a postparturient mare. Tapeworm infections have been related to host age in other Anoplocephalidae infections such as those of cattle with *Moniezia* spp. (Ramajo Martín and Muro Álvarez, 1999). Although more work is needed, the finding of *A. magna* infection in young animals and pregnant/postparturient mares could be related to factors associated to young age or pregnancy.

The higher coprological sensitivity detected towards *A. magna* and the strong preference shown by this species for young animals mean that past epidemiological studies have probably overestimated the prevalence of *A. perfoliata* in areas where both occur, especially those performed in young horses, given the morphological similarity of *Anoplocephala* spp. eggs.

Despite the morphological similarity of the eggs, the morphometric analysis revealed differences in the oncosphere diameter and major shell bisector length. In both cases, measurements were larger for *A. perfoliata* than *A. magna*. The difference in the major shell bisector is in line with the description by Soulsby (1987), yet is inconsistent with the findings of Tarazona Vilas (1999) who reported the similar or greater size of *A. magna* eggs. As for the oncosphere diameter, the figures are consistent with data provided by Tarazona Vilas (1999), although this author's oncosphere measurements for *A. magna* were smaller.

According to those morphometric data, both cut-offs, oncosphere diameter and major shell bisector length, were assigned to distinguish the eggs of *A. perfoliata* from those of *A. magna* with high accuracy, especially with the oncosphere diameter cut-off. The diagnostic implication of this finding is remarkable as no clear morphometric differentiation had been reported so far. Control programs with an epidemiological basis must rely on specific diagnoses. In this respect, current immunodiagnostic methods may not discriminate between both *Anoplocephala* spp. (Bohórquez *et al.*, 2012) and possibly the identification will rely on molecular tools. For the moment, the use of these two morphometric traits could help the coprological identification of *A. perfoliata*. Despite its many limitations, in most laboratories coprology is still a routine technique of diagnosing a parasite disease. Notwithstanding the demonstrated sensitivity problems of the copro-diagnosis of *A. perfoliata*, we propose that this method would be especially

useful in young animals reared in countries like the USA or Spain where the coexistence of both species has been demonstrated (Lichtenfels, 1975; Meana *et al.*, 2002, 2005).

Conflict of interest statement

The authors declare that no competing interest exist.

Acknowledgements

This work was supported by Virbac, S.A. The authors thank M. Martínez-Izquierdo for help with the microscopy measurements.

References

- Bohórquez, A., Meana, A., Luzón, M. 2012. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens. *Vet. Parasitol.* 190, 87-94.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M.C., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses – significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131, 1-13.
- Lichtenfels, J.R., 1975. Helminths of domestic equids. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 42 (special issue). 92 pp.
- Meana, A., Luzón, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M., 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* 74, 79-83.
- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J., 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. *Rev. Ibér. Parasitol.* 3-4, 93-95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M., 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: Infection pattern and population dynamics. *Vet. Par.* 30, 233-240.
- Noordhuizen, J. P. T. M., Frankena, K., van der Hood, C.M., Graat, E.A.M., 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands. Pp. 445.

- Ramajo Martín, V., Muro Álvarez, A., 1999. Parasitosis de los rumiantes. Cestodosis digestivas. In: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid: 229-234.
- Rebhein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2010. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J Helminthol.* 1-6.
- Schuster, R., 1991. [Morphometric analysis of an *Anoplocephala perfoliata* population]. *Angewandte Parasitologie* 32, 105-111. [In German].
- Soulsby, E. J. L., 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (1st ed. in Spanish, Translation of the 7th ed. in English). Ed. Interamericana, Mexico. 823 pp.
- Tarazona Vilas, J. M., 1999. Parasitosis de los équidos. Cestodosis intestinales: anoplocephalidosis. In: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid: 540-545.

Table 1. Tapeworm burdens and coprological results of 130 horses parasited by *A. perfoliata* and *A. magna* as a single or double infection.

INFECTION	TAPEWORM BURDEN			TOTAL ANIMALS N=130	COPROLOGICAL RESULTS	
	1-30	31-100	> 100		FAECES +	SENSITIVITY
<i>A. perfoliata</i>	65 (17) ⁺	17 (6) ⁺	13 (2) ⁺	95	25	26% (18 – 36)*
single	46 (5) ⁺	10 (1) ⁺	8 (1) ⁺	64	7	11% (5 – 21)*
double	19 (12) +	7 (5) ⁺	5 (1) ⁺	31	18	58% (40 – 75)*
<i>A. magna</i>	59 (29) +	4 (4) ⁺	3 (3) ⁺	66	36	55% (42 – 66)*
single	32 (15) +	3 (3) ⁺	0	35	18	51% (34 – 69)*
double	27 (14) +	1 (1) ⁺	3 (3) ⁺	31	18	58% (40 – 75)*

(n)⁺: animals testing positive by coprology

()*: 95% Confidence Interval

Table 2. Coprological results of 81 horses with mature tapeworms of *A. perfoliata* (n = 53) or *A. magna* (n = 28), as a single or double infection, and of 24 horses with gravid tapeworms of *A. perfoliata* (n = 10) or *A. magna* (n = 14), as a single or double infection.

INFECTION	NUMBER	COPROLOGICAL RESULTS	
	OF ANIMALS	FAECES +	SENSITIVITY (95% C.I.)
Mature <i>A. perfoliata</i>	53	8	15% (7 – 27)
single	48	7	
double*	5	1	
Mature <i>A. magna</i>	28	21	75% (55 – 89)
single	25	18	
double*	3	3	
Gravid <i>A. perfoliata</i>	10	2	20% (3 – 52)
single	10	2	
double*	0	-	
Gravid <i>A. magna</i>	14	11	79% (52 – 94)
single	5	4	
double*	9	7	

(*): Animals with double *Anoplocephala* spp. infection but having only mature or gravid tapeworms of the mentioned species.

Table 3. Results of measuring the oncosphere diameter (left) and the major shell bisector (right) in 100 eggs of *A. magna* and 100 eggs of *A. perfoliata*. The black line represents the optimal cut-off between *A. perfoliata* and *A. magna* values according to the ROC analysis. Grey area below the black line represents false positive values. Green area above the black line represents false negative values.

Oncosphere diameter (μm)	Number of eggs		Major shell bisector (μm)	Number of eggs	
	<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>		<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>
10	0	10	57.5	0	2
11.25	0	28	58.75	0	3
12.5	0	44	60	0	5
13.75	0	15	61.25	0	7
15	4	1	62.5	0	18
17.5	84	2	63.75	0	15
20	10	0	65	2	12
22.5	1	0	66.25	0	10
25	1	0	67.5	0	11
			70	10	8
			72	5	4
			75	10	5
			77.5	18	0
			80	7	0
			82.5	19	0
			85	14	0
			87.5	7	0
			90	2	0
			92.5	2	0
			100	1	0
			105	1	0
			112.5	2	0

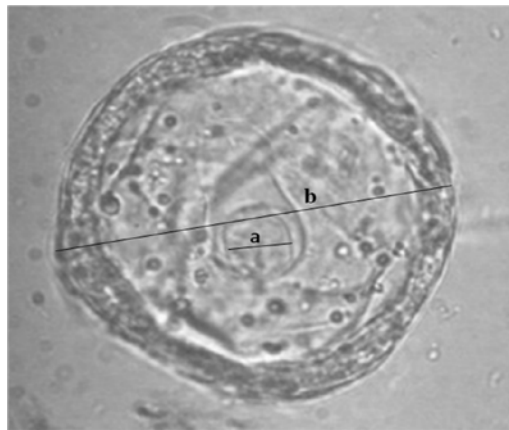


Figure 1. Egg of *Anoplocephala* spp., showing the oncosphere diameter (a) and the major shell bisector (b).

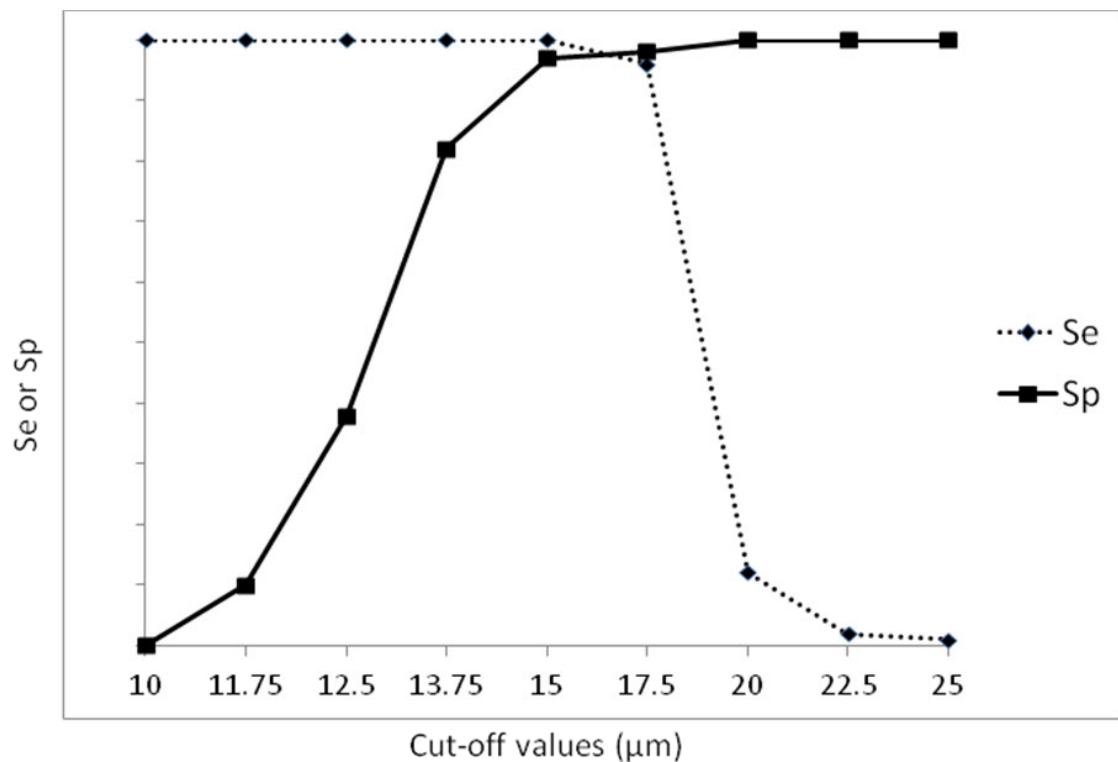


Figure 2. Sensitivity (Se) and specificity (Sp) for each potential cut-off value oncosphere diameter to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs, obtained from the observation of 100 eggs of each species.

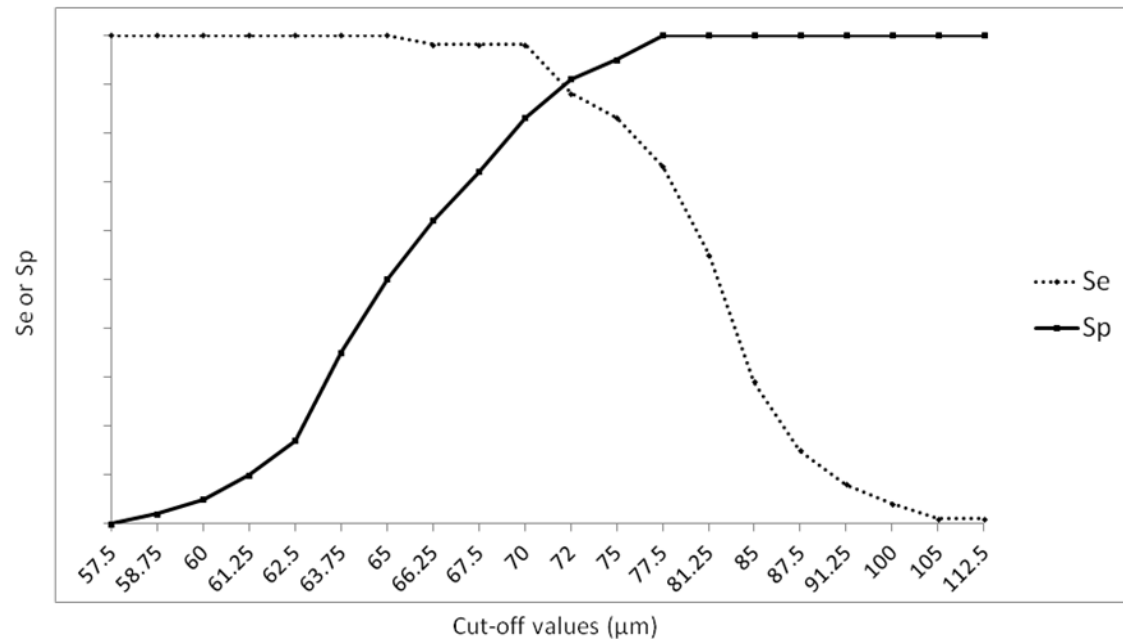


Figure 3. Sensitivity (Se) and specificity (Sp) for each potential cut-off value major shell bisector to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs, obtained from the observation of 100 eggs of each species.

4.2. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Los resultados de los objetivos del diagnóstico molecular han sido publicados bajo el título:

“New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm” (Bohórquez *et al.*, 2015; *Vet Parasitol* 207, 56 – 63).

4.2.1. RESUMEN:

Con el objetivo de posibilitar el diagnóstico diferencial entre las tres principales especies de cestodos de équidos, en el presente trabajo se diseña un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección simultánea de *A. perfoliata*, *A. magna* y *A. mamillana*. Dicho método amplifica simultáneamente las regiones genéticas hipervariables SSUrRNA en las tres especies mediante una única reacción, utilizando tres pares de cebadores que amplifican exclusivamente el espaciador 2 de transcripción interna (ITS-2) de los respectivos genes diana. Para ello hubo que diseñar dos nuevos pares de cebadores específicos para *A. magna* y *A. mamillana*. Los cebadores específicos de *A. mamillana* se diseñaron a partir de secuencias del ITS-2 del ADNr disponibles, mientras que en el caso de *A. magna*, el diseño requirió la secuenciación previa de varias regiones del ITS-2 para la detección de marcadores genéticos.

Para el análisis de reproducibilidad del método, se positivarón alícuotas de muestra fecales negativas con proglotis de *A. perfoliata*, *A. magna* o *A. mamillana*, singularmente o con mezcla de las tres especies, que fueron analizadas por la multiplex PCR, junto con alícuotas de muestras fecales negativas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en días distintos. Así mismo se analizaron extractos de DNA de aislados de las distintas especies procedentes de dos regiones geográficas (León y Guadalajara), para descartar posibles variaciones relacionadas con el origen geográfico.

Para el análisis de sensibilidad, los experimentos se llevaron a cabo sobre diluciones seriadas de ADN de *A. magna*, *A. perfoliata* y *A. mamillana*, a partir de macerados de cestodos o de huevos de cada especie, singularmente o de forma mixta. El cálculo de la concentración de ADN extraído de cada parásito adulto o

muestra de huevos se llevó a cabo mediante el método de Nanodrop. Se analizaron tres tipos de muestras: a) diluciones de 70 ng de ADN genómico de cada especie al 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 y 1/5000; b) ADN extraído de alícuotas de muestras fecales negativas positivadas con 500, 200, 100, 50 y 10 huevos, bien de *A. magna* o de *A. perfoliata* (no disponibles en *A. mamillana*); c) ADN extraído de alícuotas de 2 µl de reactivo de PCR positivadas con 80, 50, 40, 30, 10 y 1 huevos, bien de *A. perfoliata* o de *A. magna*.

En cuanto al análisis de especificidad, cada par de cebadores fue ensayado con aislados de ADN de las otras dos especies de *Anoplocephala*, así como de otros parásitos equinos relevantes como *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* y *Strongylus vulgaris*, para descartar amplificaciones cruzadas. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos para descartar posibles contaminaciones.

En cuanto a los resultados, todos los ensayos de PCR rindieron las secuencias de ADN (amplicones) deseadas (382 pb en *A. magna*, 430 pb en *A. mamillana* and 254 pb en *A. perfoliata*) cuando se probaron con muestras de ADN genómico aisladas de las respectivas especies, sin detectarse amplicones no deseados.

En los ensayos de amplificación individuales con cada par de cebadores, se comprobó la especificidad de los tres pares de cebadores con las tres especies de cestodos. Los dos nuevos cebadores para la detección de *A. magna* y *A. mamillana* mostraron una clara especificidad frente al resto de especies de cestodos. En ningún caso se detectaron productos de amplificación con los controles negativos y se demostró que el origen geográfico de los aislados no interfería con los resultados. No se detectó amplificación cruzada con el ADN de otros parásitos (*G. intestinalis*, *P. equorum*, *S. vulgaris*).

En los ensayos de amplificación utilizando los tres pares de cebadores, la máxima dilución de control positivo de ADN genómico que rindió productos específicos de las tres especies fue 1/100 (0,7 ng/µl). La dilución anterior (1/500; 0,14 ng/µl) sólo sirvió para identificar *A. magna* y *A. mamillana*, pero no *A. perfoliata* y el resto de diluciones resultaron negativas para las tres especies.

En los análisis de sensibilidad con los cebadores específicos para *A. magna* y *A. perfoliata*, utilizando muestras fecales negativas contaminadas con 500 – 10 huevos de cada especie, la mínima cantidad detectable fue de 50 huevos para cada especie. Con las diluciones seriadas de ADN puro preparado a partir de 80 – 1 huevos de cada especie en 2 µl de solución de PCR, todas las diluciones rindieron productos de *A. magna*, mientras que la máxima dilución a la que se revelaron productos de *A. perfoliata* fue la obtenida a partir de 10 huevos. Todos los resultados fueron reproducibles.

Como conclusión, el método de PCR propuesto es capaz de diferenciar infecciones causadas por las dos especies de cestodos más frecuentes en los équidos, *A. perfoliata* y *A. magna*, en presencia de huevos en heces, así como de detectar infecciones mixtas por las tres especies.

4.2.1. New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm

AUTHORS: Alejandro Bohórquez G.¹; Mónica Luzón.¹; Raquel Martín-Hernández²; Aránzazu Meana.^{1*}

¹Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

²Regional Agricultural Center & Parque Científico de Albacete (INCRECYT, FEDER) Junta de Comunidades de Castilla La Mancha, 19180 Marchamalo, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 3943903; Fax: +34 91 3943948. E-mail address: ameana@ucm.es (A. Meana).

Abstract

Although several techniques exist for the detection of equine tapeworms in serum and feces, the differential diagnosis of tapeworm infection is usually based on postmortem findings and the morphological identification of eggs in feces. In this study, a multiplex polymerase chain reaction (PCR)-based method for the simultaneous detection of *Anoplocephala magna*, *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephaloides mamillana* has been developed and validated. The method simultaneously amplifies hypervariable SSUrRNA gene regions in the three tapeworm species in a single reaction using three pairs of primers, which exclusively amplify the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) in each target gene. The method was tested on three types of sample: a) 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 and 1/5000 dilutions of 70 ng of genomic DNA of the three tapeworm species, b) DNA extracted from negative aliquots of sediments of negative control fecal samples spiked with 500, 200, 100, 50 and 10 eggs (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A. mamillana* eggs available) and c) DNA extracted from 80, 50, 40, 30, 10 and 1 egg per 2 µl of PCR reaction mix (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A. mamillana* eggs available). No amplification was observed against the DNA of *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris* (Fig. 3). The multiplex PCR method emerged as specific for the three tapeworms and was able to identify as few as 50 eggs per fecal sample and as little as 0.7 ng of control genomic DNA obtained from the three species. The method proposed is able to differentiate natural infections caused by the two most frequent species *A. magna*

or *A. perfoliata* when the eggs are present in feces and is also able to detect mixed infections by the three cestode species.

Keywords: *Anoplocephala magna*, *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephaloides mamillana*, multiplex-PCR, diagnostic.

Introduction

Tapeworm infections in horses are caused by several species found in the gut that belong to the family Anoplocephalidae (Order Cyclophyllidea). The most commonly occurring tapeworms are those of the genus *Anoplocephala*: *A. perfoliata* Goeze, 1782 and *A. magna* Abildgaard, 1789. A third cestode to affect horses is the dwarf tapeworm *Anoplocephaloides* (syn. *Paranoplocephala*) *mamillana* Mehlis, 1813. All these parasites have an indirect life cycle in which forage mites play a role as intermediate hosts. Their life cycle commences with the ingestion of mites present in soil and green grass by grazing animals.

Over the past twenty years, horse tapeworms have attracted the attention of researchers, especially since *Anoplocephala perfoliata*, a worldwide parasite that lives in and around the ileocecal valve, was directly associated with certain types of colic including ileal intussusception and spasmodic colic (Proudman *et al.*, 1998). In subsequent investigations, the presence of tapeworms was detected in serious conditions such as intestinal rupture (Ryu *et al.*, 2001), impaction or invagination (Barclay *et al.*, 1982; Beroza *et al.*, 1983; Biglietti and Garbagnati, 2000).

Prevalences reported for *A. perfoliata* can vary from low (Slocombe 1979; Lyons *et al.* 1983, Gawor 1995) to high which may depend directly on the diagnostic method used by researchers, with higher prevalences when *postmortem* than *in vivo* (for example 53% by necropsy versus 7% by coprology in Lyons *et al.* 1983), but also depending on the sampling region and climate (for example 18 – 82%, Gasser *et al.*, 2005; 15.9 - 36.5% Rehbein *et al.*, 2013). Most references to *A. magna* have mentioned a low prevalence, rarely over 4%, and scarce data exist on its repercussions on health; only two cases of massive infection concomitant with fatal cases of colic have been cited (Oliver *et al.*, 1977; Faleiros *et al.*, 2000).

The differential diagnosis of tapeworm infection relies on postmortem

findings and the morphological identification of eggs in feces. Cestode eggs are easily distinguishable from the eggs of other parasites that may also appear in feces; they are large, peculiarly shaped and contain an oncosphere within a pyriform apparatus. However, species identification of a tapeworm's egg is a difficult task.

Several techniques have been developed to improve the detection of tapeworm eggs in feces (Beroza, 1986; Proudman and Edwards, 1992; Nilsson *et al.*, 1995; Meana *et al.*, 1998; Proudman and Trees, 1999; Rehbein *et al.*, 2011). Most of these methods, based on flotation centrifugation, have shown a low to moderate sensitivity, ranging from 37 to 72.8% (Ihler *et al.*, 1995; Meana *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1995; Proudman and Edwards, 1992, Tomczuk *et al.*, 2014). Other techniques include the detection of parasite-specific antibodies in serum (Bohorquez *et al.*, 2012; Höglund *et al.*, 1995; Proudman and Trees, 1996a, b; Skotarek *et al.*, 2010), the detection of parasite antigens in serum or feces (Kania and Reinemeyer, 2005; Skotarek *et al.*, 2010), and the PCR amplification of parasite DNA in feces (Drogemuller *et al.*, 2004).

Although *A. perfoliata* is commonly considered the only epidemiologically important species, according to published data, *A. magna* (Abildgaard, 1789) is at least as prevalent in Spain (Meana *et al.*, 2002; Meana *et al.*, 2005). In addition, the findings of a recent study suggest that the 12/13 kDa excretory/secretory *A. perfoliata* antigen detected by current immunodiagnostic methods is common to both these tapeworm species, determining a risk of misdiagnosing *A. perfoliata* in areas in which *A. magna* also exists (Bohorquez *et al.*, 2012). Also current diagnosis methods may not discriminate accurately between both *Anoplocephala* spp. The high variability of sensitivity of *A. perfoliata* copro diagnosis test can be due to the presence of *A. magna* alone or coexisting with *A. perfoliata*, given the morphological similarity between the eggs of both species (distinction requires accurate measuring of oncosphere diameter and major shell bisector) and the higher sensitivity of coprology in detecting *A. magna* than *A. perfoliata* (Bohorquez *et al.*, 2014).

The introduction of molecular techniques has allowed for the accurate identification of parasite species and the determination of genetic diversity among parasite populations according to ribosomal DNA (rDNA) markers. The abundance

of rDNA in the body has led to the development of highly sensitive diagnostic techniques. Internal transcribed spacer (ITS) sequences have been a popular target of such techniques because this non-coding part of the gene has high polymorphism, that allows for species differentiation, so it have become very popular for investigating the inter- and intraspecific variation of different cestode groups (Bowles *et al.*, 1995; Drogemuller *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 1997; Van Herwerden *et al.*, 1998; Van Herwerden *et al.*, 2000; Verneau *et al.*, 1997; Verweij *et al.*, 2000; Zehnder and de Chambrier, 2000).

To date, specific primers for the PCR-amplification of rDNA have been described only for *A. perfoliata* (Drogemuller *et al.* 2004). The aim of this work was the design of an specific multiplex PCR procedure that lead to a detection of the three tapeworm species by designing new pair of primers for *A. magna* and *A. mamillana*. To do this, the sequencing of several regions of the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) in *A. magna* was also required. Finally, the development and validation of this diagnostic tool designed to simultaneously identify the three known equine tapeworms is described.

Materials and Methods

Reference tapeworms

Adult *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* and *Anoplocephaloides mamillana* tapeworms were collected from the intestines of slaughtered horses at abattoirs in different Spanish regions (Andalucía, Madrid-Guadalajara and León, located in south, central and north of Spain respectively). After cleaning with saline solution, specimens were morphologically identified (French & Chapman, 1992) and preserved in 70% ethanol until use.

DNA Extraction

Cestodes

Genomic DNA was isolated from 4 proglottids obtained from each of the 3 morphologically identified species of adult tapeworm. Each sample was ground in 5 ml water (PCR-quality) using a glass macerator. After adding a further 5 ml of water, the suspension was filtered and centrifuged for 3 min at 1,200 rpm. The

supernatant was discarded and DNA extracted from the sediment using the Magna Pure Compact Nucleic Acid isolation Kit I (Blood protocol, Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, Spain) in a Magna Pure Compact station according to the manufacturer's instructions. The DNA was quantified using NanoDrop® and stored at -20°C until use. Negative controls were run in parallel to detect possible contamination.

Eggs

Eggs were obtained directly from gravid proglottids of each tapeworm species by cutting the proglottids with a lancet in a Petri dish. Once their presence was verified under the microscope, the contents were washed with saline solution into a 10 ml tube. The eggs were then filtered, concentrated by centrifugation and counted in a Neubauer chamber. Aliquots containing approximately 6,000 eggs/ml of *A. magna* and *A. perfoliata* were stored in 70% ethanol until DNA extraction. DNA was extracted as described above for the proglottids. No gravid proglottids of *A. mamillana* were available for egg collection.

Negative control fecal samples

Feces from a tapeworm-free horse (confirmed by necropsy) were divided into 5 g portions, and additionally were checked to be free of eggs by specific tapeworm coprology (Meana *et al.*, 1998). The sediments obtained once confirmed parasite negative were preserved in aliquots (1 ml stool sediment) in 70% ethanol until use as described in validation of technique.

Tapeworm species, ITS amplification and generic primer design

1) Genetic studies on ITS regions

All sequences of the three species of tapeworm available in GenBank™ at the start of multiplex PCR design are provided in Table 1. Due to the absence of data for *A. magna*, genetic studies on ribosomal ITS regions were performed, since these regions had been identified as the most accurate species marker

Horse tapeworm published ribosomal sequences were compared using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) to identify conserved regions.

Generic *Anoplocephala* spp primers were designed to amplify the end of 18S up to 5.8S using Primer3 software (<http://simgene.com/Primer3>) on the sequence of *A. perfoliata* sequence AJ578153.1 (ITS1 primers: Forward (F) 5'-TGCTGAGAAGACGACCAAAC-3' and reverse (R) 5'-CACACAGTTGGCTGCACTCT-3'). These primers were tested with reference tapeworms (*A. magna*, *A. mamillana* and *A. perfoliata*) to compare Spanish sequences due to problematic alignments got with the sequences available at Genbank.

To get information on *A. magna* ITS2 region, *A. perfoliata* AJ578153.1 and *A. magna* AY586610 were also compiled with ClustalW. Primers were designed as previously described (ITS2-F:5'-AGAGTGCAGCCAACTGTGTG-3'; ITS2-R: 5'-ATCGGACTCGTGCCAGTATT-3') intended to amplify the end of 5.8S up to 28S region, and tested only against *A. magna* reference tapeworm.

Primer suitability (G+C content and melting temperature) was assessed using IDT OligoAnalyzer software (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligAnalyzer>). Potential primer interactions (hairpin, homodimer and heterodimer structures for the two primers) were tested using the AutoDimer program (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase//AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>).

The annealing temperatures of the ITS primer pairs were empirically determined in a gradient PCR (55 - 65°C) in a singleplex PCR reaction.

The PCR conditions used for ITS1 or ITS2 amplification were as follows: 25 µl reaction cocktail containing 12.5µl Fast Start PCR Master (3mM Cl₂Mg; Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, Spain), 0.4 µM of each primer, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, and 2.5 µl of an *Anoplocephala* spp. DNA template. All PCRs were performed in a Mastercycler ep gradient S (Eppendorf). The thermocycler program consisted of 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 65.6°C, and 45 s at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 min. All the PCR products were analysed by capillar electrophoresis in a QIAxcel System using a QIAxcelDNA High Resolution Kit (Qiagen, Las Matas, Madrid, Spain) to check the size of amplicons obtained.

Negative controls were run in parallel to detect possible contamination. Amplicons obtained with the three different species were purified (Qiaquick PCR Purification

Kit; Qiagen, Las Matas, Madrid, Spain) and then sequenced in both directions in an Applied Biosystem Genetic Analyzer 3730 automated sequencer. The sequence data obtained were visually checked using the Clustal W method (Thompson *et al.*, 1997) implemented in Chromas 1.43 software and compared using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) with the sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2) Triplex PCR:

Specific primers design

Based on the sequences obtained on ITS *A. magna* and after alignment with available data of the other horse tapeworm species, ITS2 was selected for the design of specific primers for *A. mamillana* and *A. magna* (Table 2). Design, primer suitability and primer interactions were also performed as described above. The design was focused on the final objective of the triplex PCR (different amplicon size and same optimum annealing temperature) to be combined with the previously published primers for *A. perfoliata* detection (AP-ITS2-3F and AP-ITS2-2R; amplicon size 469 bp; (Drogemuller *et al.*, 2004). So, G or GC tails were added to the 5' ends when needed to equally set the melting temperatures of each primer.

Optimization of PCR conditions

Singleplex PCR: checking and optimizing the procedure. Each specific primer for *A. mamillana*, *A. magna* and the published *A. perfoliata* primers were used in singleplex to empirically test the optimum primer's concentration (from 0.3 to 0.6 μ M) and the annealing temperature (59°C-68°C). All reactions were performed in 25 μ l reaction cocktail using Fast Start PCR Master (see above), 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, and 2.5 μ l of an *Anoplocephala* spp. DNA template. The thermocycler program consisted of 95°C for 10 min, followed by 35 cycles, of 30 s at 95°C, 30 s at 59-68°C, and 45 s at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 min. For each PCR, positive (DNA extracts from tapeworms identified by necropsy) and negative (H₂O) controls were run along. PCR amplicons were analyzed in a QIAxcel System as described before.

Triplex PCR: The three specific primers were tested in the same reaction in triplex PCR under the conditions indicated in the previous paragraph using 0.4 μ M of each

specific primer (A.magnaF1, A.magnaR1, A.perfoliataF, A.perfoliataR, A.mamillanaF1, A.mamillanaR1), 2.0 µl of each tapeworm spp. DNA template and 60°C as annealing temperature.

Triplex PCR validation: reproducibility, sensitivity and specificity

Reproducibility: aliquots of negative control fecal samples were spiked with proglottids of *A. magna*, *A. perfoliata* or *A. mamillana*, or a mix of the three species, as well, non-infected aliquots were tested to ensure that the specimens exhibited accurate, interpretable and reproducible DNA types. Each sample was tested in triplicate.

DNA isolated from parasites from two different geographic regions of Spain (Guadalajara and León provinces) were both tested to check that the geographical origin of each tapeworm species did not interfere with the diagnostic tool.

Sensitivity: These experiments were performed on serial dilutions of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* DNA prepared from macerated cestodes or the eggs of each species. The Nanodrop method was used to calculate the concentrations of DNA extracted from each adult tapeworm or egg sample.

Sensitivity was determined by individually testing *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* samples and then testing a mixture of the three species to establish the system's capacity to detect the components of mixed specimens and define the limitations of the triplex-PCR procedure.

The sensitivity of the triplex PCR procedure was determined in three types of sample: a) 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 and 1/5000 dilutions of 70 ng of genomic DNA of the three tapeworm species, b) DNA extracted from negative aliquots of sediments of negative control fecal samples spiked with 500, 200, 100, 50 and 10 eggs (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A.mamillana* eggs available) and c) DNA extracted from 80, 50, 40, 30, 10 and 1 eggs per 2 µl of PCR reaction mix (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A.mamillana* eggs available).

Specificity: Each primer pair was tested on DNA isolates of the other two Anoplocephalidae species, as well as on DNA isolates of other relevant equine parasites like *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris*, to rule out cross reactions.

All validations involved three PCRs performed on three different days using the parameters selected (annealing temperature 60°C and 0.4 µM of each primer). The products of each PCR were capillary electrophoresed. Negative controls were run in parallel to detect possible contamination.

Results

1) Genetic studies on ITS regions

For both pair of primers, best amplicons were obtained when the annealing temperature was set at 65.6°C and that was the subsequent temperature employed.

In the ITS1, sequence from the 3 tapeworm tested species were obtained. The reliable nucleotide fragment of the sequences are available at Genbank: 766 bp for *A. magna* (Accession number KJ934711), 681 bp for *A. perfoliata* (Accession number KJ934713) and 630 bp for *A. mamillana* (Accession number KJ934712). Upon alignment of all available sequences for *Anoplocephala* spp., the published AY752646 for *A. perfoliata* showed a 96% similarity with the Spanish *A. magna* new sequences KJ934711.

For the ITS2, sequences of 4 different *A. magna* isolates were obtained and are available at GeneBank® under the accession numbers KF956074 to KF956077. The reliable nucleotide fragment in this case was between 906 bp and 917 bp.

2) Triplex PCR:

Primer sequence designed for specific detection of *A. magna* and *A. mamillana* are shown in Table 2 and Figure 1. In singleplex tests, PCR test conducted on the three primer pairs, best PCR products were obtained when the annealing temperature was set between 55°C and 61°C. The temperature selected for subsequent assays was 60°C since this was the highest temperature at which amplicons could clearly be seen, consequently reducing the unspecific amplification risk. After checking the different primer concentrations in the PCR mixture (0.3-0.6 µM, data not shown), an equimolar concentration of 0.4 µM was fixed to reduce primer-dimer reactions.

All the PCR yielded the expected amplicons: 382 bp for *A. magna*, 430 bp for *A. mamillana* and 250 bp for *A. perfoliata* when tested on genomic DNA samples

isolated from four *A. magna*, three *A. mamillana* and three *A. perfoliata* adult tapeworms respectively and no undesirable amplicons were detected by capillary electrophoresis.

The specificity of the three pair of primers was demonstrated for the three tapeworm species. The two new primers to identify *A. magna* and *A. mamillana* have shown a clear specificity. As shown in Figure 2, no PCR product was yielded when we used primers specific for *A. magna* on genomic DNA from a single adult *A. mamillana* or *A. perfoliata* specimen. The same occurred when we used primers specific for *A. perfoliata* on genomic DNA isolated from the other two species.

Finally, using the three pairs of primers in the multiplex PCR procedure on DNA samples extracted from the three tapeworm species, three bands of different molecular weight were observed corresponding to each of the species tested. No PCR product was detected using the three primer pairs on negative controls (DNA-free samples). The geographical origin of each tapeworm species did not interfere with the results (data not shown).

No cross-reactivity was observed against the DNA of *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris* (Fig. 3).

When conducting PCR amplification using the three primer pairs, 1/100 (0,7 ng/μl) was the maximum dilution of positive control genomic DNA found to render specific products of the three species. The next dilution (1/500; 0,14 ng/μl) only served to identify *A. magna* and *A. mamillana* but not *A. perfoliata*. Further dilutions proved negative for all three species (Fig. S1).

When we tested the PCR sensitivity using the primers specific for *A. magna* and *A. perfoliata* on fecal samples spiked with 500 to 10 eggs of the two species, 50 eggs was the minimum amount detectable for both species (Fig. S2). Using serial dilutions of pure DNA prepared using 80 to 1 eggs of each species/2μl DNA template in 25 μl of PCR mix, all dilutions rendered amplified products of *A. magna*, whereas the most diluted *A. perfoliata* sample to score positive was the DNA sample extracted from 10 eggs (Fig. S3).

Results are reproducible as can be seen in Figure S4, even at maximum dilutions rendering a positive result in the sensitivity tests (10 eggs/2 μl) (Fig. S5).

Discussion

The present study was designed to the differential diagnosis of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* by way of a new PCR procedure based on identifying the hypervariable ITS-2 rDNA gene region of equine tapeworms.

Adult tapeworm proglottids from *A. perfoliata*, *A. magna* and *A. mamillana* were identified in a single multiplex PCR by amplicon size. According to previous accessible information for *A. perfoliata* and *A. mamillana* and the new DNA sequences obtained here for *A. magna*, the three species show high similarity in their 18S, 5.8S and 28S rDNA regions, while the ITS-2 region was observed to show greater variability. Thus, PCR-product sizes varying from 496 bp to 592 bp were observed for the three species and these differences were sufficient to design two new pairs of specific primers yielding different sized amplicons for *A. magna* (382 bp) and *A. mamillana* (450 bp). Using these primers along with previously described *A. perfoliata* primers (250 bp) as templates, the new method is able to easily differentiate the three species in samples of adult specimens, feces containing eggs or eggs obtained from feces.

Due to alignment difficulties, we were unable to use the Genbank AY752646 sequence available for an individual tapeworm identified as *A. perfoliata* in our alignments of all the existent sequences using the Clustal W method (Thompson *et al.*, 1997), given its greater similarity with the sequences obtained for *A. magna*. There is a clear need to check the veracity of the information provided by Genbank as erroneous sequences have been often published.

The method proposed should facilitate the specific diagnosis of equine tapeworms especially in areas where co-infection is present. The fact that serological diagnosis may lead to misdiagnosing of *A. perfoliata* when *A. magna* is present (Bohorquez *et al.*, 2012) could partly explain why the relationship between a colic syndrome and the presence of *A. perfoliata* based on serological detection has not been unanimously demonstrated. While some authors have found a clear link between *A. perfoliata* and colic (Proudman and trees, 1999; Veronesi *et al.*, 2009) others do not (Traversa *et al.*, 2008; Trotz-Williams *et al.*, 2008; Back *et al.*, 2013). Our multiplex PCR on animals suffering from digestive perturbances can easily detect the presence of *A. perfoliata* and *A. magna* and facilitates the specific diagnosis.

In conclusion, this paper describes the simultaneous PCR detection of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana*. Based on ITS-2 PCR protocols, the easy multiplex PCR procedure proposed offers scope for species-specific differentiation of the three tapeworms known to affect horses. Our findings indicate the possibility of running three separate singleplex PCRs in one multiplex PCR to detect DNA in tapeworm and/or egg-containing fecal samples. The PCR methods developed could be useful for the routine laboratory detection and differentiation of the three tapeworm species in horse fecal samples in areas where the three tapeworms are endemic.

The use of this technique could help to identify *A. perfoliata* among other tapeworm infections by PCR and get a clearer spectrum of the pathological repercussions of this cestode.

REFERENCES

- Back, H., Nyman, A., Osterman, L. E., 2013. The association between *Anoplocephala perfoliata* and colic in Swedish horses - a case control study. *Vet Parasitol* 197, 580-585.
- Barclay W.P., Phillips T.N., Foerner J.J., 1982. Intussusception associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in five horses. *J Am Vet Med Assoc* 180, 752-753.
- Beroza, G.A., Barclay, W.P., Phillips, T.N., 1983. Cecal perforation and peritonitis associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in three horses. *J Am Vet Med Assoc* 183, 804-806.
- Beroza, G.A. 1986. Laboratory diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses. In *The American Association of Equine Practicioners* (Nashville, Tennessee, USA), pp. 436-439.
- Biglietti, G. Garbanati, B., 2000. Cecocolic intussusception in a thoroughbred yearling. *Equine Pract* 22, 26-27.
- Bohorquez, A., Meana, A., Luzon, M., 2012. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens. *Vet Parasitol* 190, 87-94.

- Bohorquez, A., Meana, A., Pato, N.F., Luzon, M., 2014, Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*. Vet Parasitol 204, 396-401.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P., 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. Parasitology 110, 317-328.
- Drogemuller, M., Beelitz, P., Pfister, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2004. Amplification of ribosomal DNA of Anoplocephalidae: *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. Vet Parasitol 124, 205-215.
- Faleiros, R.R., de Matos, J.J.R.T., Alves, G.E.S., Santos, R.d.L., de Matos, J.J.R., 2000. *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) associada a um caso de abdome agudo equino. Revista Brasileira de Medicina Veterinária 22, 27-29.
- French, D.D., Chapman, M.R., 1992. Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. Comp Cont Educ 14, 655-661.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses-significant scope for further research, improved diagnosis and control. Parasitology 131, 1-13.
- Gawor, J.J. 1995. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. Vet Parasitol 58, 99-108.
- Höglund, J., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Uggla, A., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. Vet Parasitol 59, 97-106.
- Ihler, C.F., Rootwelt, V., Heyeraas, A., Dolvik, N.J., 1995. The prevalence and epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in Norway. Vet Res Commun 19, 487-494.
- Kania, S.A., Reinemeyer, C.R., 2005. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. Vet Parasitol 127, 115-119.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Swerczek, T.W., Crowe, MW. 1983. Parasites in Kentucky Thoroughbreds at necropsy: emphasis on stomach worms and tapeworms. Am J Vet Res 44, 839-844.
- Meana, A., Luzon, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M., 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. Vet Parasitol 74, 79-83.

- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J., 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. Research and reviews in parasitology-Revista ibérica de parasitología 3-4, 93-95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M., 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. Vet Parasitol 130, 233-240.
- Mochizuki, R., Endoh, D., Onuma, M., Fukumoto, S., 2006. PCR-based species-specific amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and its application in identification of GI nematode eggs in bovine faeces. J Vet Med Sci 68, 345-351.
- Nilsson, O., Ljungström, B.L., Höglund, J., Lundquist, H., Uggla, A., 1995. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. Acta Vet Scand 36, 319-328.
- Okamoto, M., Agatsuma, T., Kurosawa, T., Ito, A., 1997. Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Parasitology 115, 661-666.
- Oliver, D.F., Jenkins, C.T., Walding, J.P., 1977. Duodenum rupture in a nine-month-old colt due to *Anoplocephala magna*. Vet Rec 101, 80.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1992. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. Vet Rec 131, 71-72.
- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J., 1998. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. Equine Vet J 30, 194-199.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996a. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. Parasite Immunol 18, 499-506.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996b. Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. Vet Parasitol 61, 239-247.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1999. Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses. Parasitol Today 15, 156-159.

- Rehbein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2011. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. J Helminthol 85, 409-414.
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R., 2013. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. Parasitology research 112, 407-413.
- Ryu, S.H., Bak, U.B., Kim, J.G., Yoon, H.J., Seo, H.S., Kim, J.T., Park, J.Y., Lee, C.W., 2001. Cecal rupture by *Anoplocephala perfoliata* infection in a thoroughbred horse in Seoul Race Park, South Korea. J Vet Sci 2, 189-193.
- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P., 2010. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. Vet Parasitol 172, 249-255.
- Slocombe, J.O.P., 1979. Prevalence and treatment of tapeworms in horses. Can Vet J, 20, 136-140.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25, 4876-4882.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Szczepaniak, K.O., Grzybek, M., Studzińska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczeń-Karczmarz, M., 2014. Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. Parasitol Res 113(6):2401-6.
- Traversa, D., Fichi, G., Campigli, M., Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C.J., Pellegrini, D., Perrucci, S., 2008. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). Vet Parasitol 152, 271-277.
- Trotz-Williams, L., Physick-Sheard, P., McFarlane, H., Pearl, D.L., Martin, S.W., Peregrine, A.S., 2008. Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. Vet Parasitol 153, 73-84.

- Van Herwerden, L., Blair, D., Agatsuma, T., 1998. Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology* 116, 311-317.
- Van Herwerden, L., Gasser, R.B., Blair, D., 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* 30, 157-169.
- Verneau, O., Renaud, F., Catzeflis, F., 1997. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. *Mol Biol Evol* 14, 630-636.
- Verweij, J.J., Polderman, A.M., Wimmenhove, M.C., Gasser, R.B., 2000. PCR assay for the specific amplification of *Oesophagostomum bifurcum* DNA from human faeces. *International Journal for Parasitology* 30, 137-142.
- Veronesi, F., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2009. *Anoplocephala perfoliata* infestation and colic in horses. *Vet Res Commun* 33, S161-S163.
- Wickström, L.M., Haukialmi, V., Varis, S., Hantula, J., Henttonen, H., 2005. Molecular phylogeny and systematics of anoplocephaline cestodes in rodents and lagomorphs. *Systematic Parasitology* 62, 83-99.
- Zehnder, M.P., de Chambrier, A., 2000. Morphological and molecular analyses of the genera *Peltidocotyle* Diesing 1850 and *Othinoscotyle* Woodland 1933, and a morphological study of *Woodlandiella* Freze, 1965 (Eucestoda, Proteocephalidea), parasites of South American siluriform fishes (Pimelodidae). *Syst Parasitol* 46, 33-43.

Table 1. Partial gene sequences published in the literature for the three tapeworm species.

Tapeworm	GenBank™ Accession No.	Gene sequence	Authors
<i>A. mamillana</i>	AJ578155	18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S	(Drogemuller <i>et al.</i> , 2004)
	AJ578154	18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S	(Drogemuller <i>et al.</i> , 2004)
	AY569770	28S	(Wickström <i>et al.</i> , 2005)
<i>A. magna</i>	AY586610	28S	(Wickström <i>et al.</i> , 2005)
	AB099691	COX-1	(Mochizuki <i>et al.</i> , 2006)
	AY568206	COI	(Wickström <i>et al.</i> , 2005)
<i>A. perfoliata</i>	AJ578151	18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S	(Drogemuller <i>et al.</i> , 2004)
	AJ578152	18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S	(Drogemuller <i>et al.</i> , 2004)
	AJ578153	18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S	(Drogemuller <i>et al.</i> , 2004)
	AY569769	28S	(Wickström <i>et al.</i> , 2005)
	AY752646	18S - ITS1 - 5.8S	(Wickström <i>et al.</i> , 2005)
	AB099690	COX-1	(Mochizuki <i>et al.</i> , 2006)
	AY568189	COI	(Wickström <i>et al.</i> , 2005)

Table 2. Primers designed for the multiplex PCR-detection of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* based on the ITS-2 rDNA region.

Specific Primers	Sequence*	PCR product size	Specificity	
A.magnaF1	<u>CCCGG</u> TTTGTGTGTGTGGAGTT	382 pb	<i>A. magna</i>	This work
A.magnaR1	CGCAACCTATTAACAGCTCA			
AP-ITS2-3F	AATTGTGGGGGCTTCTCTTA	254 pb	<i>A. perfoliata</i>	Drogemuller <i>et al.</i> , 2004
AP-ITS2-2R	ACCTCGTGCCTTTCTTTAT			
A.mamillanaF		430 pb	<i>A. mamillana</i>	This work
1	<u>CGCG</u> CCTCACCCCAATATGCAATTG			
A.mamillanaR	<u>GCGCG</u> CATATTTACTCTTATCACAT			
1	TGC			

* CG tails added to primers are underlined

		<i>A. mamillana</i> F	
<i>A. magna</i>	CTTGCAAGTAGAAATTGCTGCTGCCAGACCGCTACCTTGCTCTCTCTGTGTGTGT	59	
<i>A. perfoliata</i>	CCTGCAAGTAGAAATTGCTGCTGCTAGTTCCCTACCTTGCTCTCTATGTGTGTATAC	60	
<i>A. mamillana</i>	--AACGGAAAACTGACTGCT-CTTCTCCTCACCCCAATATGCAATTGCTTGTGTGTG-	56	
		<i>A. magna</i> F	
<i>A. magna</i>	CTTCTGCTGTGATTTGGGCGAGCAGGCAGGTGCGGGTAGTATGCAAATGAATTGTAG	118	
<i>A. perfoliata</i>	CTCTGTGTGTATTGGGCGAGCAGGCAGGCAGGAGCGGGTGGTATGCAATTG	120	
<i>A. mamillana</i>	-----TGTGCGTGCAACT---CTG-CATGTGGGTGAGTGAGTTGAGCAGTCTATTTTTCG	107	
		<i>A. perfoliata</i> F	
<i>A. magna</i>	-GGGCTTCTCTTAAAGGTGTAGTCACAGTGGTGGCAGGAAGGAG-CTTATGGTTGGTAGT	176	
<i>A. perfoliata</i>	-GGGCTTCTCTTAAAGGTGTAGTCACAGTGGTGGCAGGAAGGAGCCCTTATGATTGGTAGT	179	
<i>A. mamillana</i>	CGGACTTCTCTTAAAGGTGTAGTCACGTTAGTGGCAAGGAG----CTTGTGGTTGTGAGT	163	
<i>A. magna</i>	ACTGGCTGCTACTA-----TACGCCAGAGTATG----CAGAATGG-----CT	214	
<i>A. perfoliata</i>	ACCAGCTGCTACTA-----TGCGCCACAGTATG----AAGAAGGG-----CC	217	
<i>A. mamillana</i>	GCCAGTACTACTACTACTACTACTACTACTCTCGTGTGTGCCCTTACTAGTACAACCTACC	223	
<i>A. magna</i>	AGTTGATTAGTGGATGTGTTTG-TGTATATTACTG-----TGTGTA-----TCCTA	259	
<i>A. perfoliata</i>	AATTGGTTGGTGGACGTGTATG-TGTATATTCTG-----TGTG-----TCCTA	260	
<i>A. mamillana</i>	GGTTGATTAAGGAGTGAATGCGGTGTATACTGATGGTAAGGCATGTGCAGTACACACCCA	283	
<i>A. magna</i>	CTGATCAA-----CAT-----GGGCCTTTCTCTACG---TGGTGCT	292	
<i>A. perfoliata</i>	CTGATCAG-----TAT-----AGGCCTTTCTCTACG---TGGTGCT	293	
<i>A. mamillana</i>	TTGATCCGGTATTGTGTGTGTATGTATTTAGTTGGGGGCTCTACCACCAGCAGCGGTAGT	343	
		<i>A. perfoliata</i> R	
<i>A. magna</i>	GGTAGAGCTATAATGCACTAACCGTGGCCTAGTGTGTGCGTGTGTTTTTGTGTAAGAA	352	
<i>A. perfoliata</i>	GGTAGAGCTATAATGCACTAACCGTGGCCTAGTGTGTCTCTATGTTTTGTAT	353	
<i>A. mamillana</i>	AGTAGGGCGACAATTCATAATCGTGGCCTAGTGT---TCTGTG-TATATGTGTATG---	396	
<i>A. magna</i>	AGGCACGAGGTGTGTATTGTAGCATTG-AAAGCCG---GTTAAACAGCCAGTC--ATGGT	406	
<i>A. perfoliata</i>	AGGCACGAGGTGTGTATTGTAGCATTG-AAAGCTG---GTTAAACAGCCAGTC--ATGGT	407	
<i>A. mamillana</i>	--GCACGAAGTGTGCATTGTGGCATTGTATAGCTGAAAGCAATACATCCAACC	454	
		<i>A. magna</i> R	
<i>A. magna</i>	AGCTCCATTATTAA	465	
<i>A. perfoliata</i>	AGCTCCATTATTAA---GCTATCAATAGGT-TGCATGCATGCATGCATGCTTGCTT---	460	
<i>A. mamillana</i>	GATAAGAGTAAATATGACAGTTAGAAGCTGTGTGTATTAGCATAATAGGTTGCATG---	511	
<i>A. magna</i>	AACCTGACCTCAGATCAGTCGTGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG	525	
<i>A. perfoliata</i>	-----		
<i>A. mamillana</i>	-----		
<i>A. magna</i>	AAAAGAACTAACCAGGATTCCTTGGTAACGGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCCAGCACC	585	
<i>A. perfoliata</i>	-----CATGGGTAA-----	469	
<i>A. mamillana</i>	-----CATGCGTGCAAGCATG---CGTGGTTAAA-----	537	
<i>A. magna</i>	GAAGCCT	592	
<i>A. perfoliata</i>	-----		
<i>A. mamillana</i>	-----		

Fig. 1. ITS-2 rDNA sequence alignments for *A. magna* (592 bp; GenBank Accession No. KF956074), *A. perfoliata* (469 bp; GenBank Accession No. AJ578153) and *A. mamillana* (537 bp; GenBank Accession No. AJ578155).

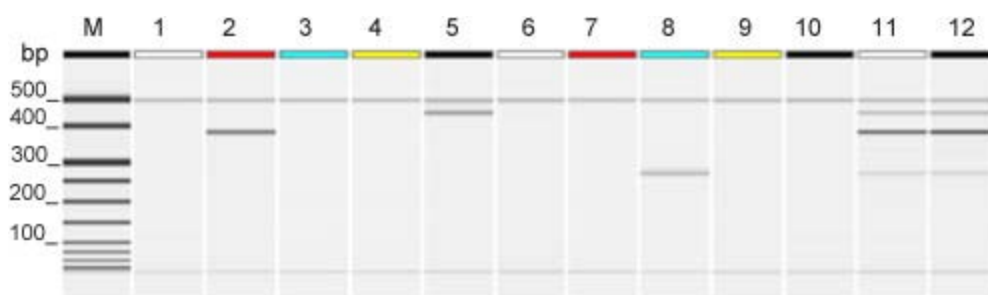


Fig. 2. Specificity of the multiplex PCR procedure determined by capillary electrophoresis. Lane M - DNA size marker (ordinate values in bp), Lane 1 - negative control lacking DNA, Lanes 2-4 - primers specific for *A. magna* plus genomic DNA from one adult *A. magna* (lane 2), *A. mamillana* (lane 3) or *A. perfoliata* (lane 4) specimen, Lanes 5-7 primers specific for *A. mamillana* plus genomic DNA from one adult *A. mamillana* (lane 5), *A. magna* (lane 6) or *A. perfoliata* (lane 7) specimen, Lanes 8-10 - primers specific for *A. perfoliata* plus genomic DNA from one adult *A. perfoliata* (lane 8), *A. magna* (lane 9) or *A. mamillana* (lane 10) specimen, Lanes 11,12 - three pairs of primers on a mixed sample of DNA from all three tapeworm species.

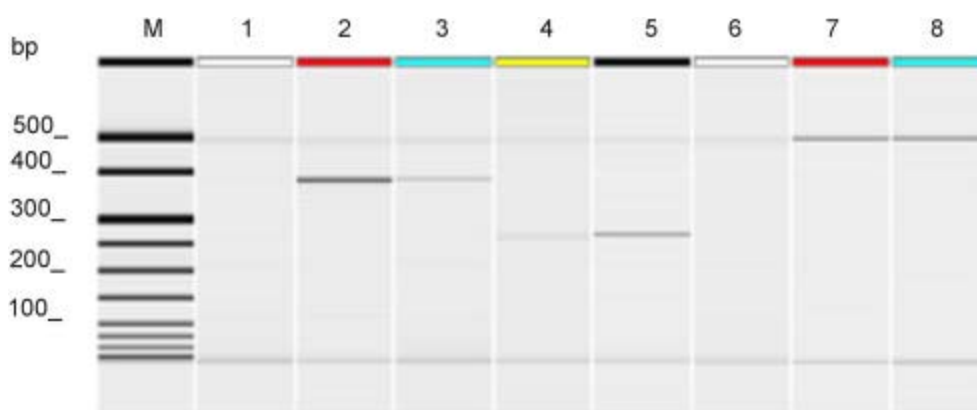


Fig. 3. Specificity of the multiplex PCR, Lane M - DNA size marker (ordinate values in bp), Lane 1 - negative control lacking DNA, Lanes 2-8 - primers specific for *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana*. Genomic DNA from one adult *A. magna*, *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris*, lanes 2-3. Genomic DNA from one adult *A. perfoliata*, *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris*, lanes 4-5. Genomic DNA from one adult *Gasterophilus intestinalis* (lane 6), *Parascaris equorum* (lane 7) and *Strongylus vulgaris* (lane 8).

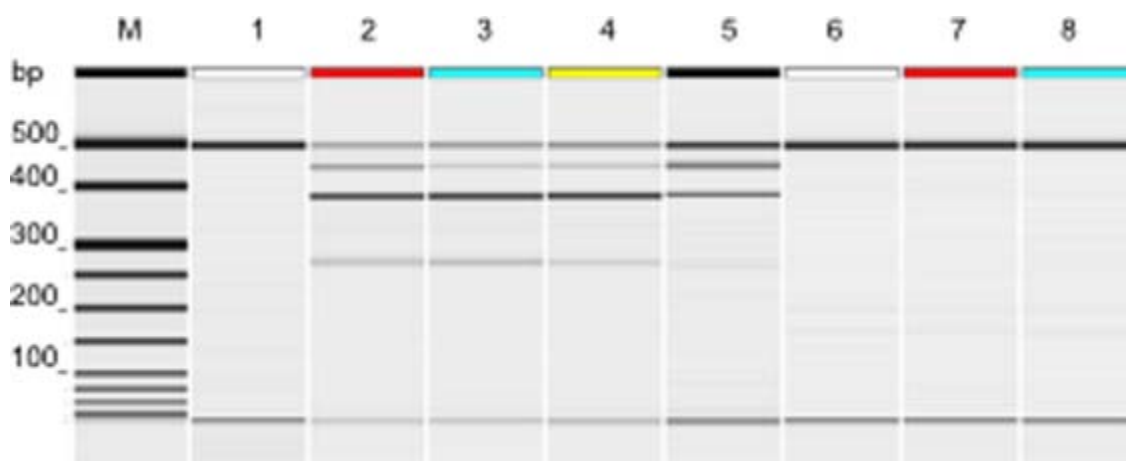


Fig. S1. Sensitivity of the multiplex PCR procedure. Samples of genomic DNA (70 ng) of the three species as positive controls (lane 2), DNA dilutions 1/10 (lane 3), 1/100 (lane 4), 1/500 (lane 5), 1/1000 (lane 6), 1/2000 (lane 7), and 1/5000 (lane 8). Also included were a negative control lacking DNA (lane 1) and a molecular marker (lane M).



Fig. S2. Sensitivity of the multiplex PCR procedure when differentiating between *A. magna* and *A. perfoliata* using fecal samples. Dilutions of negative fecal samples spiked with eggs of the two species containing 500 eggs (lane 4), 200 eggs (lane 5), 100 eggs (lane 6), 50 eggs (lane 7), and 10 eggs (lane 8). Also included were a negative control lacking eggs (lane 1 and 9), a positive control containing *A. magna* eggs (lane 2), a positive control containing *A. perfoliata* eggs (lane 3) and a molecular marker (lane M).

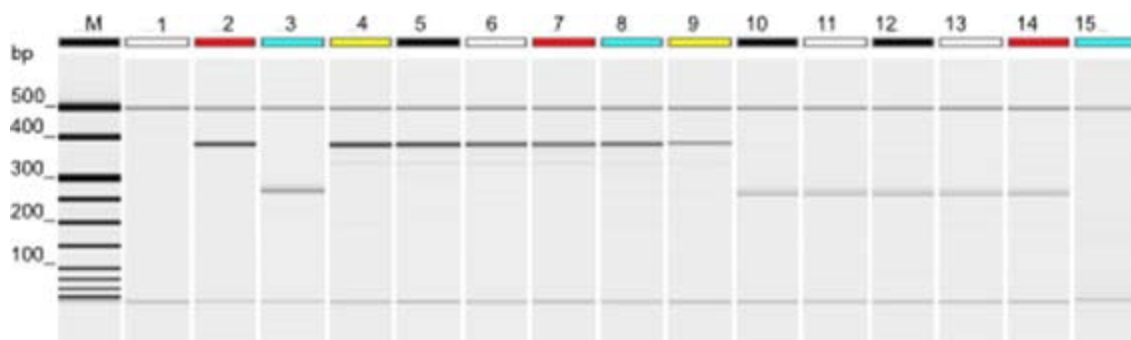


Fig. S3. Sensitivity of the multiplex PCR procedure for differentiating between *A. magna* and *A. perfoliata* using DNA samples. Samples of genomic DNA from *A. magna* were prepared as 80, 50, 40, 30, 10 and 1 eggs/2 μ l of PCR mix (lanes 4-9). Samples of genomic DNA from *A. perfoliata* were prepared as 80, 50, 40, 30, 10 and 1 eggs/2 μ l of PCR mix (lanes 10-15). Also included were a molecular marker (lane M), a negative control lacking DNA (lane 1), a positive control containing *A. magna* DNA (lane 2) and a positive control containing *A. perfoliata* DNA (lane 3).

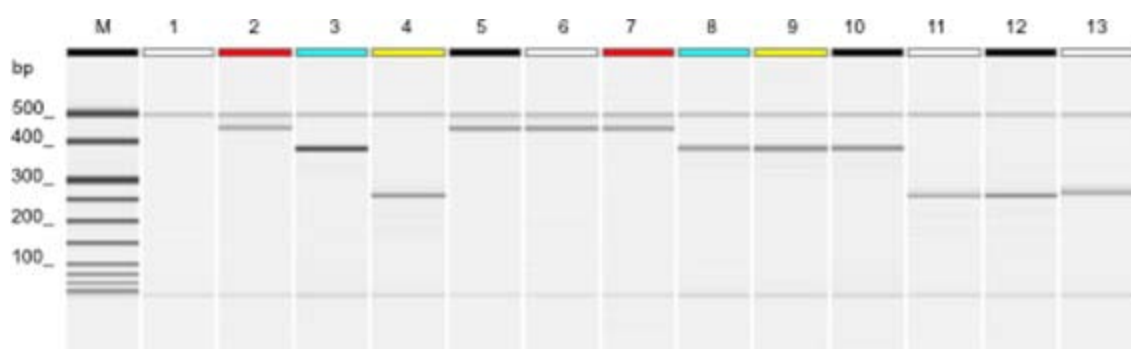


Fig. S4. Differential detection of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* by multiplex PCR. Samples of genomic DNA (70 ng) from *A. mamillana* (lane 2), *A. magna* (lane 3) and *A. perfoliata* (lane 4) and three different DNA extractions from three different samples of *A. mamillana* (lanes 5-7), *A. magna* (lanes 8-10) and *A. perfoliata* (lanes 11-13). Also included were a negative control lacking DNA (lane 1) and a PCR molecular marker (lane M).

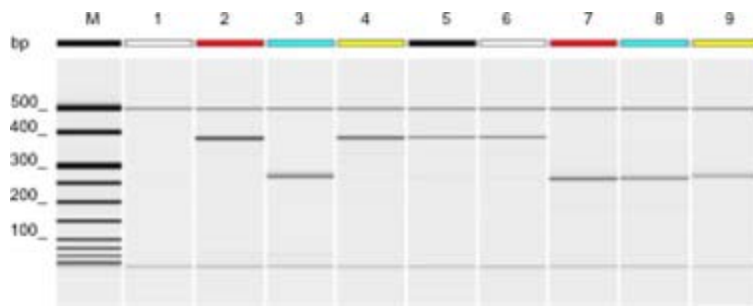


Fig. S5. Differential detection of *A. magna*, and *A. perfoliata* eggs by multiplex PCR. Samples of egg DNA obtained from *A. magna* (lane 2) and *A. perfoliata* (lane 3) and three different DNA extractions from three samples of 10 eggs/2 μ l of *A. magna* (lanes 4-6) and *A. perfoliata* (lanes 7-9). Also included were a negative control lacking DNA (lane 1), and a PCR molecular marker (lane M).

4.3. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Los resultados de los objetivos del diagnóstico inmunológico han sido publicados bajo el título:

“Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *A. magna* antigens” (Bohórquez *et al.*, 2012; *Vet Parasitol* 190, 87 – 94).

4.3.1. RESUMEN:

En el presente estudio se evalúa la especificidad del antígeno E/S de 12/13 kDa de *A. perfoliata* en el diagnóstico diferencial con *A. magna*, y se obtienen y caracterizan nuevos antígenos E/S y somáticos, a fin de compararlos con los antígenos homólogos de *A. perfoliata* y determinar su utilidad potencial en el diagnóstico diferencial entre ambas especies.

A lo largo de repetidos muestreos llevados a cabo en dos mataderos, ubicados en las provincias de Segovia y León, se procesó el paquete gastrointestinal de 179 équidos en busca de cestodos. Los ejemplares recogidos fueron identificados y almacenados en PBS. Siempre que fue posible se recogió una muestra de sangre de venas mesentéricas de cada tracto gastrointestinal, a fin de extraer y almacenar el suero a -20°C.

La obtención de los respectivos antígenos E/S de *A. perfoliata* y *A. magna* fue realizada según el método descrito por Proudman y Trees (1996a) para *A. perfoliata*. Para la obtención de los respectivos antígenos somáticos de las dos especies, se seleccionaron escólex y los primeros proglotis de ejemplares de cada especie y se procesaron según la metodología descrita por Høglund *et al.* (1995) y Sahu *et al.* (2009). Tras su cuantificación proteica (Bradford, 1976), los antígenos fueron almacenados a -20°C. Los antígenos fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para su caracterización proteica, y las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF) para ser enfrentadas a los sueros por inmunoblot. Todos los análisis electroforéticos y las electrotransferencias fueron realizados en la Unidad de Proteómica de la UCM-PCM. Para los inmunoblots se seleccionaron 20 sueros en función del estatus

parasitológico de los équidos: con parasitación exclusiva por *A. magna* (n = 8) o por *A. perfoliata* (n = 6), con parasitación mixta por ambas *Anoplocephala* spp. (n = 1), y negativos a cestodos (n = 5). El estatus parasitario de los animales, referente a nematodos o artrópodos digestivos, fue también anotado.

Nuestros resultados revelaron que la región de 12 – 14 kDa del antígeno E/S crudo de *A. perfoliata* es reconocida tanto por sueros de caballos positivos a *A. perfoliata* como positivos a *A. magna*, lo que indica la existencia de reactividad cruzada entre los componentes inmunogénicos de ambas especies a este nivel.

En cuanto a la comparación del antígeno somático de *A. perfoliata* obtenido en nuestro estudio con el descrito por Hoglund *et al.* (1995), nuestro análisis electroforético reveló un patrón más amplio en la región de bajo peso molecular, dada la detección de bandas de 23 kDa y 10/11 kDa. El inmunoblot reveló reactividad en la región de 10-14 kDa, sólo frente a sueros de animales positivos a cestodos, tanto homólogos (*A. perfoliata*) como heterólogos (*A. magna*), indicando reactividad cruzada entre los antígenos somáticos de ambos cestodos a ese nivel.

Los resultados de este estudio constituyen la primera descripción de la composición antigénica de *A. magna*. El patrón proteico del antígeno E/S de *A. magna* difirió fundamentalmente del de *A. perfoliata* en la ausencia de bandas en el rango de 26 – 40 kDa, y el antígeno somático, en la presencia de bandas en *A. magna* de 18 y 14 kDa, ausentes en *A. perfoliata*. Por inmunoblot, no se detectó reacción aparente en el antígeno E/S de *A. magna* frente a sueros homólogos ni heterólogos, mientras que el antígeno somático reveló reactividad en la región de 10 – 14 kDa, nuevamente de carácter genérico, no específico.

En resumen, los resultados del estudio revelan la existencia de componentes inmunoreactivos de bajo peso molecular en los antígenos crudos E/S y somático de *A. perfoliata* y somático de *A. magna* que son reconocidos por sueros de caballos positivos a *Anoplocephala* a nivel genérico, pero no específico. La reactividad cruzada entre esos componentes desaconseja su uso en el diagnóstico diferencial entre ambas *Anoplocephala* spp.

4.3.2. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *A. magna* antigens

Alejandro Bohórquez, Aránzazu Meana, Mónica Luzón*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040, Madrid. Spain.

*Corresponding author. Tel. +34 91 3943948; Fax: +34 91 3943908. E-mail address: mluzon@vet.ucm.es (M. Luzón).

Abstract

The tapeworm responsible for equine colic, *Anoplocephala perfoliata*, is considered the most common intestinal tapeworm of horses worldwide. However, there is evidence that *A. magna* has a similar prevalence in North America and Spain, and possibly in other countries, highlighting the need for diagnostic methods capable of distinguishing between these two species. Currently, immunodiagnosis of *A. perfoliata* is based on the identification of the 12/13 kDa excretory/secretory (E/S) *A. perfoliata* immunoreactive antigen, which while apparently specific, has never been tested in sera from *A. magna*-positive horses. Accordingly, we evaluated the specificity of 12/13 kDa E/S *A. perfoliata* antigen for the first time by testing this crude antigen against *A. magna*-positive sera in Western blot. In addition, we characterized a somatic (Som) crude antigen of *A. perfoliata* and for the first time, the E/S and Som crude antigens of *A. magna*, evaluating their potential utility for the differential serodiagnosis of equine anoplocephalosis in sera from horses of known parasitic status. SDS-PAGE revealed major low MW bands at: 14 and 12 kDa for E/S and Som-*A. magna*; 14 and 11 kDa for E/S *A. perfoliata*; and 11 and 10 kDa for Som-*A. perfoliata*. Protein regions at 12-14 kDa (E/S *A. perfoliata*), 10-15 kDa (Som-*A. perfoliata*) and 10-12 kDa (Som-*A. magna*) were recognized by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. These findings demonstrate cross-reactivity of these unpurified antigenic components, precluding their use in differential diagnosis between *A. perfoliata* and *A. magna*. Although these results do not directly indicate cross reactivity at the purified 12/13 kDa component of the E/S *A. perfoliata* antigen, it is possible that current immunodiagnostic methods based on this

component might not accurately differentiate between these two tapeworm species, suggesting erroneous diagnosis of *A. perfoliata* in areas where *A. magna* is present.

Key Words: *Anoplocephala magna*; *A. perfoliata*; antigens; immunodiagnosis.

Introduction

Anoplocephala perfoliata (Goeze, 1782), a cestode of the Anoplocephalidae family in the order Cyclophyllidea, is a common intestinal tapeworm of horses worldwide (Gasser *et al.*, 2005). This cestode has been increasingly associated with bowel irritation, intussusceptions and intestinal obstruction in horses (review by Gasser *et al.*, 2005). Significantly, *A. perfoliata* increases the gravity of lesions and the risk of ileal impaction and spasmodic colic, particularly in horses chronically infected with many tapeworms (Proudman and Edwards, 1993; Proudman *et al.*, 1998; Tinker *et al.*, 1997; Rodríguez-Bertos *et al.*, 1999, Traub-Dargatz *et al.*, 2001). Accurate detection of this cestode is crucial for both epidemiological and clinical reasons. To date, several diagnostic strategies have been employed, including the detection of parasite eggs in faeces using centrifugation and flotation techniques (Beroza *et al.*, 1986; Proudman and Edwards, 1992; Nilsson *et al.*, 1995; Meana *et al.*, 1998; Proudmann and Trees, 1999; Rehbein *et al.*, 2010), the detection of parasite-specific antibodies in serum (Hoglund *et al.*, 1995; Proudman and Trees, 1996a,b), the detection of parasite antigens in serum or faeces (Kania and Reinemeyer, 2005), and amplification of parasite-specific DNA in faeces by PCR (Traversa *et al.*, 2008). The advantages and disadvantages of each approach regarding sensitivity and specificity have been reviewed (Gasser *et al.* 2005), and their efficacies evaluated (Traversa *et al.*, 2008; Skotarek *et al.*, 2010). To date, all available diagnostic methods have been designed assuming that *A. perfoliata* is the only epidemiologically significant tapeworm to parasitize domestic horses in most parts of the world. However, this assumption does not hold true in countries where *A. magna* is at least as prevalent as *A. perfoliata*, such as USA (data compiled by Lichtenfels, 1975). In Spain, prior to 2002, *A. perfoliata* was the only major tapeworm considered in anti-helminthic control strategies for Spanish equines, due to the absence of *A. magna* and a very low prevalence of *Anoplocephaloides*

mamillana (Cordero del Campillo *et al.*, 1994). However, since the first detection of *A. magna* in abattoirs in North and Central Spain (Meana *et al.*, 2002), this cestode has been frequently detected throughout the country (about 18% *A. magna* versus 24% *A. perfoliata* with 11% cases of mixed infection) (Meana *et al.*, 2005).

A. magna (Abilgaard, 1789) is a cestode that parasitizes the fore-regions of the small intestine of equines. Little information is available regarding its possible pathogenic role and only a few reports of clinical disease have been associated with massive infections (Oliver *et al.*, 1997; Faleiros *et al.*, 2000). Given the limited pathogenicity of this tapeworm, the time consuming process of examining the entire small intestine and the failure of coprological tests to differentiate between *A. magna* and *A. perfoliata* eggs, *A. magna* infections generally pass unnoticed. Thus, a diagnostic method is required to discriminate between *A. perfoliata* and *A. magna* infections. Most of the currently available immunodiagnostic methods (Western blot analysis, serum-based ELISA, coproantigen ELISA) are based on the use of either E/S *A. perfoliata* crude antigen (Proudman and Trees, 1996a) or its purified 12-13 kDa immunoreactive component (Proudman and Trees, 1996b). The specificity of these antigens for the diagnosis of *A. perfoliata* is supported by the absence of cross-reactivity with protein antigens from *A. mamillana* and other helminths (Proudman and Trees, 1996a,b). However, to the best of our knowledge, this antigen has never been tested against *A. magna*-positive sera. In this study we tested *A. magna* sera against E/S *A. perfoliata* crude antigen for the first time in Western blots, evaluating the specificity of the 12/13 kDa component. In addition, we used SDS-PAGE to characterise the somatic crude antigen of *A. perfoliata* and, for the first time, the excretory/secretory and somatic crude antigens of *A. magna*, assessing their potential use in the differential serodiagnosis of equine anoplocephalosis by Western blot analysis. Our findings indicate the existence of low MW immunoreactive components of E/S *A. perfoliata*, Som-*A. perfoliata* and Som-*A. magna* antigens that are recognised by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. The data suggest that the tools currently available for immunodiagnosis may not accurately distinguish between these two species.

Materials and Methods

2.1. Processing of individual horses

Full gastrointestinal tracts were obtained in multiple samplings between 2006 and 2010 from horses slaughtered at two abattoirs, one located in Segovia (Central Spain) and the other in León (Northern Spain). Digestive tracts were taken to the respective Veterinary Medicine faculties (University Complutense of Madrid or the University of León) within one hour of slaughter and fully opened in the necropsy room, where the entire mucosal surface of each gastrointestinal tract ($n = 179$) was examined macroscopically for the presence of parasites. All tapeworms were removed, counted, classified as *A. perfoliata* or *A. magna* according to their location and morphology, and stored in phosphate buffered saline (PBS). A blood sample was taken when possible from the mesenteric veins of each gastrointestinal tract and the sera collected was stored at -20°C .

2.2. Antigen preparation

E/S antigens for each *Anoplocephala* sp. were prepared as described by Proudman and Trees (1996a), with minor modifications. Live worms were washed twice for 5 min with a saline/glucose/antibiotic solution (0.9% NaCl, 2.5 mg ml⁻¹ glucose, 200 U.I. ml⁻¹ penicillin, 200 µg ml⁻¹ streptomycin) at 37°C . Groups of worms (40 - 60 *A. perfoliata* vs 10-20 *A. magna*) were placed in 100 ml of PBS (pH 7.2) and incubated at 37°C for 5 hours. Harvested incubation medium was centrifuged twice at $2000 \times g$ for 20 min at 5°C . The supernatants were then removed and, after the second spin, filtered successively through 1.8 µm, 0.8 µm and 0.22 µm syringe filters (ALBET ®).

For somatic antigen preparation, groups of previously identified scolices and first proglottids of worms from each *Anoplocephala* sp. were selected (Proudman and Trees, 1996a), repeatedly washed in PBS and stored at -20°C . After thawing, the material was collected in a small volume of PBS in a glass tissue grinder and homogenised on ice (Höglung *et al.*, 1995). The homogenised material was sonicated 10 times (15 s per cycle with 15 s cooling intervals) at 20 kHz in an ultrasonic disintegrator (SONOPLUS HD 2070, LABOLAN, Spain). The sonicated material was then centrifuged for 30 min at 14,000 r.p.m. (Sahu *et al.*, 1999) and the supernatant was collected and filtered successively through 1.8 µm, 0.8 µm and 0.22 µm syringe

filters (ALBET®).

For both types of antigen, the protein was quantified by the Bradford method (1976) using the Protein Assay kit 2 (Bio-Rad, Hercules, USA), with bovine serum albumin as the standard. Samples were stored at -20°C until use.

2.3. SDS-PAGE characterization

Several batches of each antigen were analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at the Proteomics Facility of the UCM-PCM, a member of ProteoRed-ISCIH network. Samples were reduced by boiling in 5% 2-mercaptoethanol and electrophoresed in 15% polyacrylamide gels. Approximately 20 µg of antigen was loaded per well in a total volume of 25 µl. Molecular weight markers (Precision Plus Protein™ Standards Bio-Rad, Hercules, USA) of a wide molecular spectrum (10 - 250 kDa) were run adjacent to the antigens. Proteins were visualized with colloidal Coomassie blue (CCB) stain.

2.4. Western blot analysis

The separated proteins were transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes at the Proteomics Facility of the UCM-PCM, and visualized using Ponceau red stain. Immunoblot analysis was performed according to the Protein Blotting Guide (Bio-Rad, 2006). Vacant protein binding sites were blocked with 5% skimmed milk powder (SMP) in Tris-buffered saline (TBS) for 1 hour. The PVDF membranes were cut into strips and incubated for 1 hour with individual test sera diluted 1:250 in 5% SMP/TTBS (0.05% Tween in TBS) at room temperature. After incubation with test sera, the membranes were washed in TTBS (3 x 5 minutes) and incubated for 1 hour at room temperature with rabbit anti-horse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:1,000 in 5% SMP/TTBS, followed by washes in TTBS (2 x 5 min) and TBS (5 min). The PVDF strips were then incubated for 20 min at room temperature in substrate (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride at 0.5 mg ml⁻¹ in TBS: HRP Colour Development Reagent, DAB Blotting grade, BioRad) containing 3% hydrogen peroxide, at a dilution of 1:1,000. After incubation, membranes were washed with distilled water (2 x 10 min) and dried in air.

2. 5. Characterization of the sera analysed

A total of 135 serum samples were collected from horses following necropsy via a full-length cut along the gut. Due to the *post-mortem* source of the blood and the site of collection (mesenteric veins), many sera samples had to be excluded from the experiment because of poor quality and/or insufficient sample volume. In order to avoid recently cleared infections in animals selected as negative controls, tapeworm-negative sera samples collected other than in autumn/winter seasons were discarded, based on previous evidences on *A. perfoliata* seasonality in Spain which indicated a yearly summer to spring pattern of infection of horses (Meana *et al.*, 2005). Finally, 20 samples were chosen on the basis of their quality, quantity and tapeworm infection status, to study the immunogenic reactivity of the four antigens in western blots. The samples included sera from horses specifically classified as *A. magna*-positive only (n = 8), *A. perfoliata*-positive only (n = 6), *A. perfoliata*- and *A. magna*-positive (n = 1) or tapeworm negative (n = 5). Sera samples were examined in Western blots first with E/S *A. perfoliata* and *A. magna* antigens (all 20 sera samples) and subsequently with Som-*A. perfoliata* and *A. magna* antigens (11 sera samples). Due to insufficient sample volume, 9 sera were run out before being probed with the somatic antigens. Western blot assays were repeated up to three times to verify the reproducibility of the results. The parasitic status of the animals was recorded, indicating tapeworm burdens and the presence of other digestive parasites (Table 1).

Results

Of a total of 179 horses analyzed by necropsy, 42 were parasitized by *A. perfoliata*, 22 by *A. magna* and 19 by both *A. perfoliata* and *A. magna*. The maximum parasitic load was 476 tapeworms for *A. perfoliata* and 76 for *A. magna*.

1. SDS-PAGE

For the E/S *A. perfoliata* antigen (Fig. 1, lane 4), the major protein bands were detected at 81, 47, 41, 35, 30, 25, 17, 14 and 11 kDa, while the Som-*A. perfoliata* antigen (Fig 1, lane 2) revealed major bands at 120, 94, 75, 45, 40, 34, 30,

23, 11 and 10 kDa. Major bands were detected for the E/S *A. magna* antigen (Fig 1, lane 3) at 94, 77, 46, 40, 23, 14 and 12 kDa, and for the Som-*A. magna* antigen (Fig 1, lane 1) at 136, 92, 73, 45, 40, 34, 23, 18, 14 and 12 kDa.

2. Western blot analysis

Low MW (< 15 kDa) bands were detected for three of the four crude antigens against most tapeworm-positive sera, and each antigen presented a specific pattern of bands (Figures 2 to 4). The low MW proteins recognized by each serum are shown individually (Table 2).

For the E/S *A. perfoliata* antigen, a protein region at 12-14 kDa was recognized by sera from all *A. perfoliata*-positive horses (Fig. 2, lanes 5 to 8 in), 5 of the 8 *A. magna*-positive horses (Fig. 2, lanes 1, 2 and 4), and by the *A. perfoliata*-plus *A. magna*-infected serum, but not by any sera from tapeworm-negative horses (Fig 2, lanes 9 and 10). Comparable recognition patterns were observed in all replicates of the assay (see Table 2).

For the Som-*A. perfoliata* antigen, a diffuse region at 10-15 kDa (Fig 3) was recognized by sera from most *A. perfoliata*-positive and *A. magna*-positive horses, although the results for 1 *A. perfoliata*- and 2 *A. magna*-positive horses were not reproducible (Table 2 and Fig. 3, lanes 1, 3, 5). No such reaction was observed for sera from *Anoplocephala*-negative horses.

For the E/S *A. magna* antigen, no low molecular protein bands were clearly recognized by any sera from *Anoplocephala*-positive or -negative horses in any assay (Table 2 and Figure 4).

Finally, for the Som-*A. magna* antigen, a protein region at 10-12 kDa (Fig. 5) was recognized by sera from most *A. magna*-positive and *A. perfoliata*-positive horses, although the results for 1 *A. magna*- and 2 *A. perfoliata*-positive horses were not reproducible (Table 2 and Fig 5, lanes 1 and 5). No such reaction was observed for sera from *Anoplocephala*-negative horses.

Discussion

Most immunodiagnostic methods currently used to detect *A. perfoliata* infection (Western blot analysis, serum-based ELISA, coproantigen ELISA) are based on the use of either E/S *A. perfoliata* crude antigen (Proudman and Trees,

1996a) or its purified 12/13 kDa immunoreactive component (Proudman and Trees, 1996b). The specificity of these methods is supported by the lack of cross-reactivity between the 12/13 kDa component of the E/S *A. perfoliata* antigen and protein antigens from *A. mamillana* and other helminths (Proudman and Trees, 1996a,b). Our results corroborate this specificity as far as nematodes (*Parascaris*, *Strongylus*, Cyatostominae) and arthropods (*Gasterophilus*) are concerned, since no reactivity against this antigenic component was detected for sera from tapeworm-negative horses infected with these parasites. However, to the best of our knowledge, this antigen had never been tested against *A. magna*-positive sera. Our results indicate that a 12 to 14 kDa region of the E/S *A. perfoliata* crude antigen is recognized by both *A. perfoliata*- and *A. magna*-positive sera, indicating cross-reactivity of these immunogenic components of E/S *A. perfoliata* antigen with *A. magna* protein antigens.

Other antigenic components of *A. perfoliata* have been described in the literature. Höglund *et al.* (1995) characterized a somatic crude antigen from scolices of *A. perfoliata* with the most prominent bands found within the 31-45 kDa and 66-200 kDa molecular weight (MW) ranges. The authors tested the antigen in Western blots and observed a heterogeneous banding pattern within the 50-70 kDa range, depending on the extent of tapeworm-related intestinal lesions. Accordingly, the major bands at 66 kDa and 70 kDa in *A. perfoliata*-positive sera were not observed in sera from tapeworm-negative horses with no intestinal lesions. In a subsequent study, a sequential pattern of bands at 10, 35, 45 and 66 kDa was reported, depending on the time since infection (Höglund *et al.*, 1998). Our results with a homologous somatic *A. perfoliata* antigen revealed a wider pattern of recognition at the low MW level, with bands also detected at 23 kDa and 10-11 kDa. In contrast to the banding pattern described previously (Höglund *et al.*, 1995), we found no differences between tapeworm-positive and tapeworm-negative sera above the 20 kDa level, whereas at lower MWs, a 10-14 kDa region was only present in tapeworm-positive sera. Again, this immunogenic component was recognized by both homologous (*A. perfoliata*) and heterologous (*A. magna*)-positive sera, indicating cross-reactivity.

Our results constitute the first description of the antigenic composition of *A. magna*. The protein pattern of the E/S *A. magna* antigen mainly differed from that

of *A. perfoliata* due to the absence of bands within the 23-40 kDa range in E/S *A. magna*. The somatic *A. magna* antigen differed from its *A. perfoliata* counterpart in the presence of two bands at 18 and 14 kDa. Contrary to expected after SDS-PAGE analysis, there was no apparent reaction of E/S *A. magna* antigen at the lower MWs in Western blots with any homologous or heterologous sera. In fact this was not a unique result since the four antigens showed some SDS-PAGE bands apparently absent in Western blots and vice versa. The apparent absence of low MW bands in Western blots of E/S *A. magna* seems to indicate weak reactivity of those components against *Anoplocephala* positive sera, although other possibilities like the presence of an interfering substance in the antigen should be checked. As for the somatic *A. magna* antigen, reactivity was detected at 10 to 14 kDa but this was genus specific and evident for both *A. magna* and *A. perfoliata*-positive sera.

Using ELISA, a statistical correlation was described between infection intensity and specific IgG antibody levels against the 12/13 kDa affinity-purified component of excretory/secretory *A. perfoliata* antigen (Proudman and Trees, 1996b), which was proposed as a useful diagnostic measure of the risk of *A. perfoliata*-associated colic. However, this correlation could not be reproduced by other authors (Traversa *et al.*, 2008; Skotarek *et al.*, 2010). Considerable variation in antibody levels among horses with similar infection intensities has been described in serum ELISA with somatic antigen (Höglund *et al.* 1995). Interestingly, a seasonal pattern in antibody levels has also been described, reflecting the establishment of newly acquired infection (Höglund *et al.*, 1995, 1998). As for our results, we found no apparent relationship between the intensity of infection and serum reactivity in Western blot for either *A. perfoliata* (the horse with the highest parasitic burden had the least reactive serum) or *A. magna* (one of the reactive sera came from a horse with only four tapeworms). However, our observations are not necessarily in conflict with those of Proudman and Trees (1996b) since Western blot is not a quantitative assay and any clear correlative relationship may well not be apparent with our western blot experiments. We can offer no simple explanation for the variation in reactivity among homologous sera. For example, the low or null reaction with the homologous E/S and somatic antigens observed for the serum from the horse with the highest *A. perfoliata* burden (138 tapeworms) cannot be easily attributed to a newly-acquired infection,

as the horse was slaughtered in late March when infection is generally well established (Meana *et al.*, 2005). Other factors that affect serological results may account for the differences observed between homologous sera, such as individual variability in host immune response or modification of the host immune system by the parasite (Höglund *et al.*, 1995; Proudman and Trees, 1996a,b).

In conclusion, our findings indicate the existence of low MW immunoreactive components of unpurified E/S *A. perfoliata*, Som-*A. perfoliata* and Som-*A. magna* antigens that are recognised by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. The cross-reactivity of these components precludes their use in differential diagnosis between *A. perfoliata* and *A. magna*. Although these results do not directly indicate cross reactivity at the purified 12/13 kDa component of the E/S *A. perfoliata* antigen, it is possible that the current immunodiagnostic methods using this component might not accurately differentiate between these two tapeworm species, suggesting a risk of erroneous *A. perfoliata* diagnoses in areas where *A. magna* is present. To clarify this point, Western blots with the purified 12/13 kDa component of E/S *A. perfoliata* antigen should be assayed. Control programs with an epidemiological basis must rely on specific diagnoses. In the absence of specific antigenic components, the differential diagnosis between *Anoplocephala* spp. in horses would rely on *post-mortem* identification, underscoring the need for a molecular approach.

Acknowledgements

We acknowledge the “Universidad Complutense of Madrid” for financial support (Project PR1/07-14418-A). We gratefully thank Miss Nélida F. Pato for great help in the collection and processing of digestive tracts.

References

- Beroza, G.A., Marcus, L.C., Williams, R., Bauer, S.M., 1986. Laboratory diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses. In The American Association of Equine Practicioners, 32nd Convention. Nashville, Tennessee, USA, pp. 436-439.

- Bio-Rad, 2006. Protein Blotting Guide. A guide to transfer and detection. 3rd edition. http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2895.pdf. (Last visited 07/28/2011).
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Faleiros, R.R., de Matos, J.J.R.T., Alves, G.E.S., Santos, R. de L., de Matos, J.J.R. 2000. *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) asociada a um caso de abdome agudo equino. *Rev. Bras. Med. Vet.* 22, 27-29.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M.C., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses – significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131, 1-13.
- Höglund, J., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Uggla, A., 1995. Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. *Vet. Parasitol.* 59, 97-106.
- Kania, S.A., Reinemeyer, C.R., 2005. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. *Vet. Parasitol.* 127, 115-119.
- Lichtenfels, J.R., 1975. Helminths of domestic equids. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 42 (special issue). 92 pp.
- Meana, A., Luzón, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M., 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* 74, 79-83.
- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J., 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. *Rev. Ibér. Parasitol.* 3-4, 93-95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M., 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: Infection pattern and population dynamics. *Vet. Par.* 30, 233-240.
- Nilsson, O., Ljungström, B.L., Höglund, L.H., Uggla, A., 1995. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta Vet. Scand.* 36, 319-328.
- Oliver, D.F., Jenkins, C.T., Walding, P., 1977. Duodenum rupture in a nine-month-old colt due to *Anoplocephala magna*. *Vet. Rec.* 101, 80.

- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1992. Validation of a centrifugation /flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet. Rec.* 25, 71-72.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1993. Are tapeworms associated with equine colic? A case control study. *Equine Vet. J.* 25, 224-226.
- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J., 1998. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet. J.* 30, 194-199.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996a. Use of excretory / secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. *Vet. Parasitol.* 6, 239-247.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996b. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. *Parasite Immunol.* 18, 499-506.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1999. Tapeworm as a cause of intestinal disease in horses. *Parasitol. Today* 15, 156-159.
- Rebhein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2010. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J Helminthol.* 1-6. doi: 10.1017/S0022149X10000751.
- Rodríguez-Bertos, A., Corchero, J., Castaño, M., Peña, L., Luzón, M., Gómez-Bautista, M., Meana, A. 1999. Pathological alterations caused by *Anoplocephala perfoliata* infection in the ileocecal junction of equids. *J. Vet. Med. A* 46, 261-269.
- Sahu, P.S., Parija, S.C., Narayan, S.K., Kumar, D., 2009. Evaluation of an IgG-ELISA strategy using *Taenia solium* metacestode somatic and excretory-secretory antigens for diagnosis of neurocysticercosis revealing biological stage of the larvae. *Acta Trop.* 110, 38-45.
- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P., 2010. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. *Vet. Parasitol.* 172, 249-255.
- Tinker, M.K., White, N.A., Thatcher, C.D., Pelzer, K.D., Davis, B., Carmel, D.K., 1997. Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet. J.* 29, 448-453.

- Traub-Dargatz, J.L., Koral, C.A., Seitzinger, A.H., Garber, L.P., Forde, K., White, N.A., 2001. Estimate of the national incidence of colic and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. J.A.V.M.A. 219, 67-71.
- Traversa, D., Fichi, G., Campligli, M, Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C.J., Pellegrini, D., Perrucci, S., 2008. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). Vet. Parasitol. 152, 271-277.

Table1. Parasite infection status of 20 animals selected for serum analysis after *post-mortem* examination. Tapeworm burdens (individual intensities) as well as detection of other digestive parasites expressed as positive (+) *versus* negative (-) are shown.

Horse	Ap	Am	<i>Parascaris</i>	Cyatostominae	<i>Strongylus</i>	<i>Gasterophilus</i>
1	-	10	+	+	+	+
2	-	76	-	-	+	+
3	-	30	-	-	-	-
4	-	4	-	+	+	+
5	138	-	+	+	-	+
6	46	-	-	+	+	+
7	8	-	+	-	+	+
8	98	-	-	-	+	+
9	-	-	+	+	-	+
10	-	-	-	+	-	+
11	-	26	-	-	-	-
12	-	5	+	-	+	+
13	-	8	+	+	+	+
14	-	3	-	-	-	-
15	216	-	-	+	+	+
16	35	-	+	-	-	+
17	25	137	+	-	+	+
18	-	-	+	-	-	+
19	-	-	+	-	-	+
20	-	-	-	-	-	-

Ap (*A. perfoliata*)

Am (*A. magna*)

Table 2. Serum recognition of low MW proteins, expressed as positive (+) vs negative (-), of 20 animals selected for Western blot (WB) analysis against the four antigens studied, showing the tapeworm status of the animals. Not reproducible results (variation between assays) are expressed as +/-.

Horse	Tapeworm burden		WB serum recognition of low MW proteins			
	Ap	Am	E/S Ap	E/S Am	Som-Ap	Som-Am
1	-	10	+	-	+ / -	+ / -
2	-	76	+	-	+	+
3	-	30	-	-	+ / -	+
4	-	4	+	-	+	+
11	-	26	+	-	+	+
12	-	5	-	-	n.d.	n.d.
13	-	8	+	-	n.d.	n.d.
14	-	3	-	-	n.d.	n.d.
5	138	-	+	-	+/-	+/-
6	46	-	+	-	+	+/-
7	8	-	+	-	+	+
8	98	-	+	-	+	+
15	216	-	+	-	n.d.	n.d.
16	35	-	+	-	n.d.	n.d.
17	25	237	+	-	n.d.	n.d.
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	n.d.	n.d.
19	-	-	-	-	n.d.	n.d.
20	-	-	-	-	n.d.	n.d.

Ap (*A. perfoliata*)

Am (*A. magna*)

n.d. (not performed)

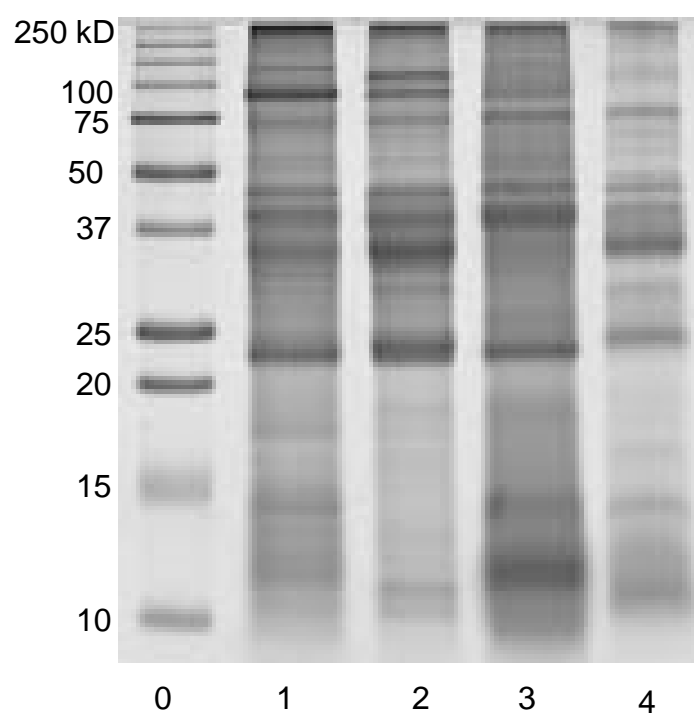


Fig. 1. Characterization of antigens by SDS-PAGE. Lane 0: molecular weight markers; Lane 1: Som-*A. magna* antigen; Lane 2: Som-*A. perfoliata* antigen; Lane 3: E/S *A. magna* antigen; Lane 4: E/S *A. perfoliata* antigen.

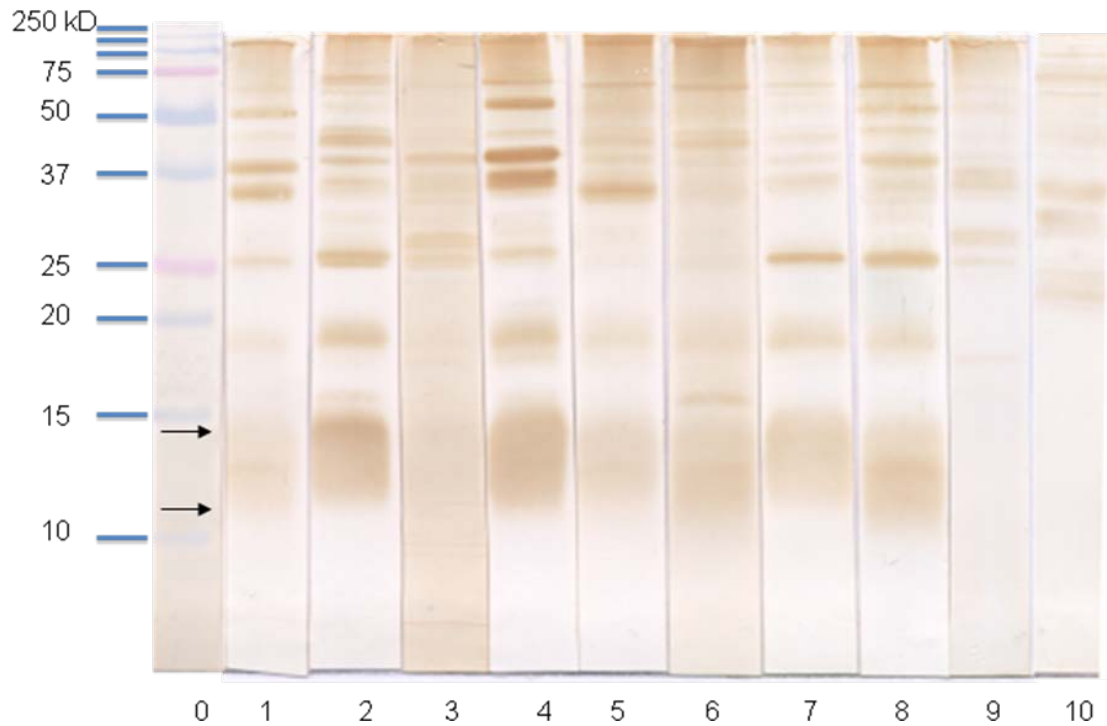


Fig. 2. Western blot analysis of immunoreactive proteins in E/S *A. perfoliata* antigen against some representative sera. The low MW region recognized by *Anoplocephala*-positive sera at genus level is labelled with arrows. Lane 0: molecular weight markers; Lanes 1-4: sera from *A. magna*-positive horses (1-4 in Table 1 and 2); Lanes 5-8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5-8 in Table 1 and 2); Lanes 9-10: sera from tapeworm-negative horses (9-10 in Table 1 and 2).

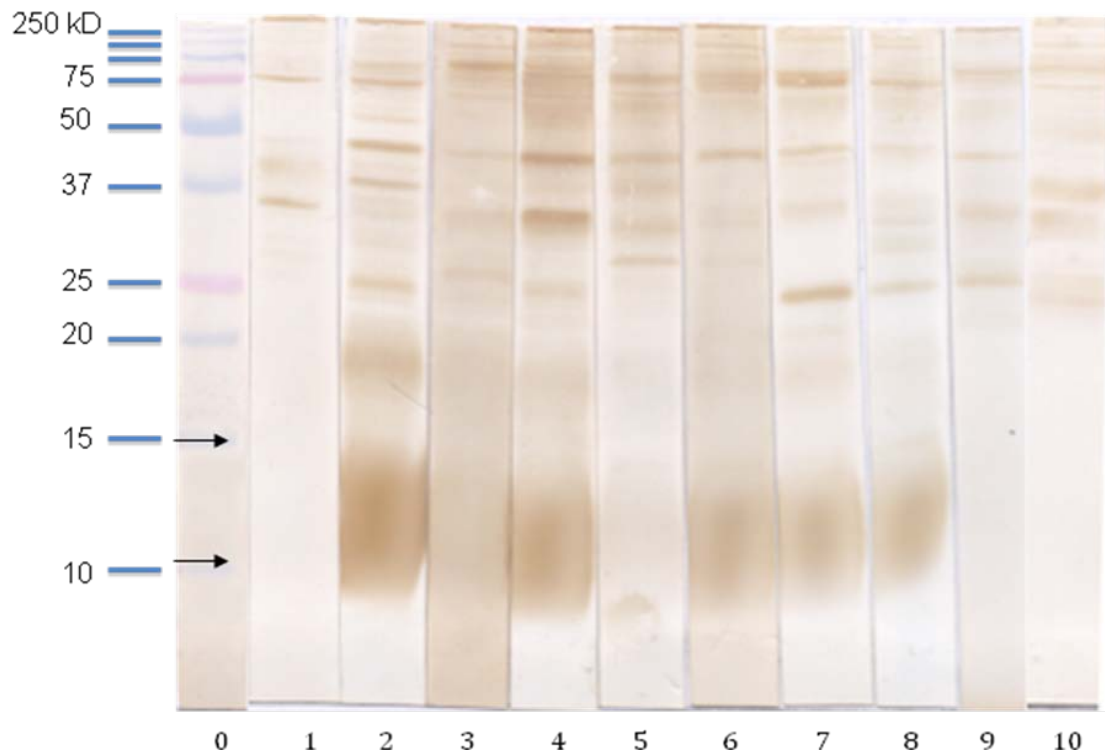


Fig.3. Western blot analysis of immunoreactive proteins in Som-*A. perfoliata* antigen against some representative sera. The low MW region recognized by *Anoplocephala*-positive sera at genus level is labelled with arrows. Lane 0: molecular weight markers; Lanes 1-4: sera from *A. magna*-positive horses (1-4 in Table 1 and 2); Lanes 5-8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5-8 in Table 1 and 2); Lanes 9-10: sera from tapeworm-negative horses (9-10 in Table 1 and 2).

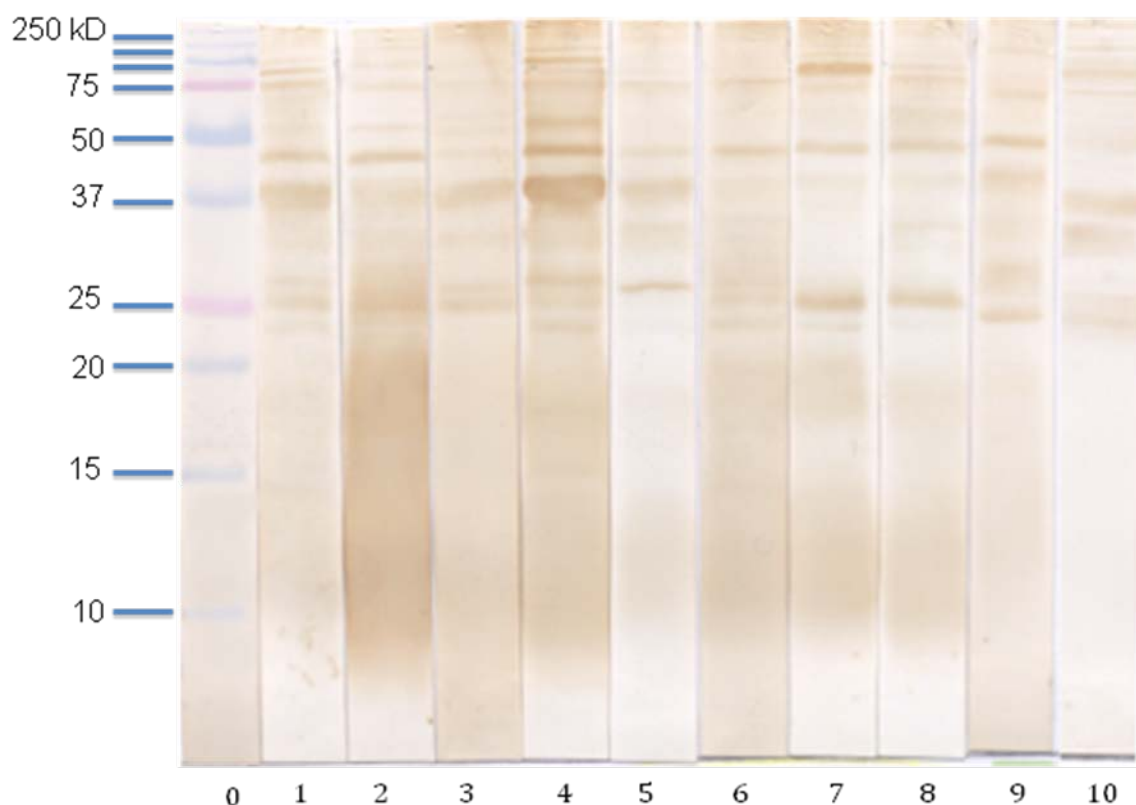


Fig. 4. Western blot analysis of immunoreactive proteins in E/S *A. magna* antigen against some representative sera. Lane 0: molecular weight markers; Lanes 1-4: sera from *A. magna*-positive horses (1-4 in Table 1 and 2); Lanes 5-8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5-8 in Table 1 and 2); Lanes 9-10: sera from tapeworm-negative horses (9-10 in Table 1 and 2).

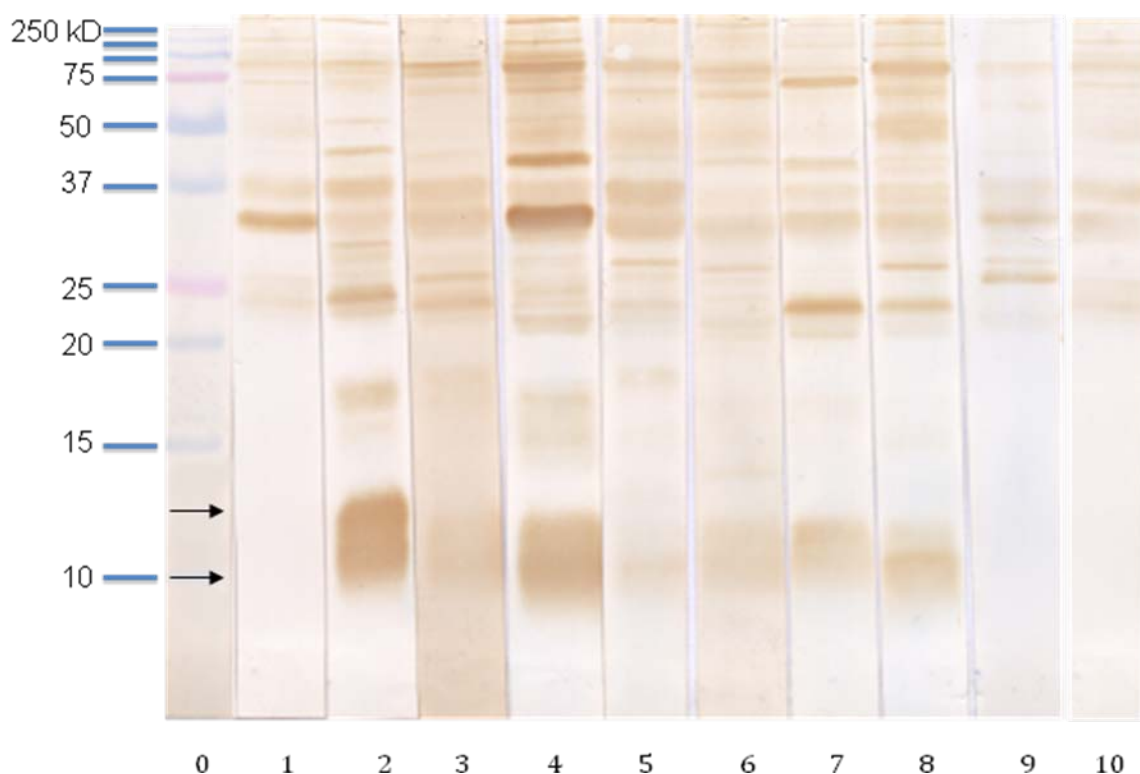


Fig. 5. Western blot analysis of immunoreactive proteins in Som-*A. magna* antigen against some representative sera. Lane 0: molecular weight markers; Lanes 1-4: sera from *A. magna*-positive horses (1-4 in Table 1 and 2); Lanes 5-8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5-8 in Table 1 and 2); Lanes 9-10: sera from tapeworm-negative horses (9-10 in Table 1 and 2).

4.3.3. ANEXO I. RESULTADOS NO PUBLICADOS DEL INMUNODIAGNÓSTICO.- ELISA

Como complemento del estudio de inmunodiagnóstico, el antígeno E/S de *A. perfoliata* obtenido para el desarrollo de los estudios presentados en esta memoria fue utilizado para la realización de un ELISA basado en el método descrito por Proudman y Trees (1996a) para el diagnóstico de la infección por *A. perfoliata*.

Se seleccionaron 18 animales con infección conocida mediante necropsia, cuyos sueros fueron enviados a un laboratorio de referencia para ser analizados por ELISA con el antígeno purificado de 12/13 kDa de *A. perfoliata* (Proudman y Trees, 1996b). Quince de dichos animales fueron a su vez analizados mediante el ELISA elaborado en nuestro laboratorio frente al antígeno crudo E/S de *A. perfoliata*. Los resultados obtenidos con los dos ELISAs se muestran en la Tabla 1 y el análisis de eficacia de cada método, en las tablas 2 y 3.

Según los resultados obtenidos, la sensibilidad de los dos métodos en la detección de la infección por *A. perfoliata* fue del 100% (Tablas 2 y 3). Por su parte, la especificidad del ELISA en la detección de *A. perfoliata* resultó nula con el antígeno purificado (Tabla 2) y fue del 50% con el antígeno crudo (Tabla 3), si bien, excluyendo los animales negativos a cestodos la especificidad del ELISA con el antígeno crudo fue del 0%. Considerando la infección por *Anoplocephala* spp. de forma global, el ELISA con antígeno crudo E/S mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% en la detección de infecciones por cestodos (Tabla 4).

Por otra parte, se seleccionaron 31 animales con infección pura por *A. perfoliata* controlada por necropsia y se analizaron por ELISA con antígeno crudo E/S (Tabla 5). Se calculó el coeficiente de correlación (r) entre la carga parasitaria y la densidad óptica (D.O.) obtenida por ELISA con el programa Statgraphics Centurión, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,57 ($P < 0,05$) (Fig. 1).

Tabla 1. Resultados no publicados del diagnóstico por ELISA realizado en 18 caballos analizados por necropsia con infección pura con *A. perfoliata* (2 animales), pura con *A. magna* (4 animales), infección mixta por *Anoplocephala* spp. (7 animales), o negativos a cestodos (5 animales).

ANIMAL	NECROPSIA		ELISA D.O. (Interpretación de resultados)	
	<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>	Ag 12/13 kDa (a) <i>A. perfoliata</i>	Ag E/S (b) <i>A. perfoliata</i>
1	0	0	1,011 (++)	0,645 (+)
2	0	0	0,601 (+)	0,248 (-)
3	0	0	0,525 (+)	0,115 (-)
4	0	0	0,485 (+)	0,334 (-)
5	0	0	1,091 (++)	0,231 (-)
6	0	30	1,753 (++)	0,604 (+)
7	0	30	1,209 (++)	1,2756 (++)
8	0	10	0,555 (+)	NO HECHO
9	0	76	0,876 (++)	0,775 (+)
10	138	0	1,276 (++)	1,803 (++)
11	46	0	1,465 (++)	NO HECHO
12	65	130	>2,000 (++)	1,764 (++)
13	13	20	1,851 (++)	0,803 (+)
14	18	13	1,513 (++)	1,828 (++)
15	4	20	1,805 (++)	1,533 (++)
16	3	5	1,892 (++)	1,850 (++)
17	23	170	>2,000 (++)	1,955 (++)
18	21	137	0,669 (+)	NO HECHO
			<0,2: NEGATIVO	0,386*
			0,2- 0,6: MODERADO	(C+) 1,803
			>0,6: ELEVADO	(C-) 0,334

(a) ELISA con antígeno E/S purificado de 12/13 kDa de *A. perfoliata* (realizado en laboratorio de referencia según Proudman y Trees, 1996b)

(b) ELISA con antígeno E/S crudo de *A. perfoliata*, realizado en nuestro laboratorio según método descrito por Proudman y Trees (1996a)

* Punto de corte = Media de D.O. del control negativo + (Desviación Estándar x 2)

(C+) control positivo; (C-) control negativo

Tabla 2. Evaluación de la eficacia del diagnóstico de *A. perfoliata* por ELISA con antígeno E/S purificado de 12/13 kDa.

	NECROPSIA +	NECROPSIA -	TOTAL
ELISA +	9 (a)	9 (b)	18
ELISA -	0 (c)	0 (d)	0
TOTAL	9 (a + c)	9 (b + d)	18

Sensibilidad (a / a + c) = (9 / 9) = 100%

Especificidad (d / b+d) = (0 / 9) = 0%

Tabla 3. Evaluación de la eficacia del diagnóstico de *A. perfoliata* por ELISA con antígeno crudo E/S.

	NECROPSIA +	NECROPSIA -	TOTAL
ELISA +	7 (a)	4 (b)	11
ELISA -	0 (c)	4 (d)	4
TOTAL	7 (a + c)	8 (b + d)	15

Sensibilidad (a / a + c) = (7 / 7) = 100%

Especificidad (d / b+d) = (4 / 8) = 50%

Tabla 4. Evaluación de la eficacia del diagnóstico de cestodosis por ELISA con antígeno crudo E/S de *A. perfoliata*.

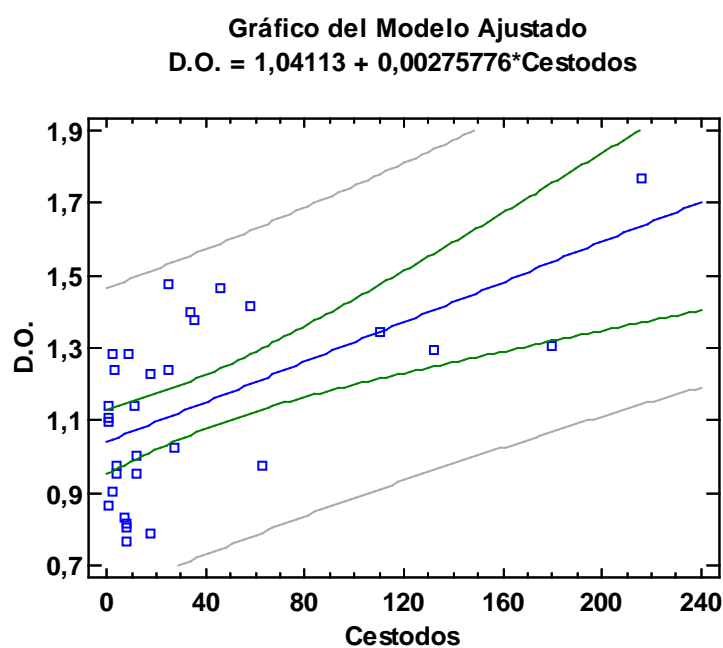
	NECROPSIA +	NECROPSIA -	TOTAL
ELISA +	10 (a)	1 (b)	11
ELISA -	0 (c)	4 (d)	4
TOTAL	10 (a + c)	5 (b + d)	15

Sensibilidad (a / a + c) = (10 / 10) = 100%

Especificidad (d / b+d) = (4 / 5) = 80%

Tabla 5. Relación de intensidades de parasitación y densidades ópticas (D.O.) en 31 caballos con infección monoespecífica analizados por ELISA con antígeno E/S crudo de *A. perfoliata*.

ANIMAL	ELISA D.O.	NECROPSIA (nº cestodos <i>A. perfoliata</i>)
1	1,418	58
2	1,476	25
3	1,237	3
4	0,954	4
5	1,096	1
6	1,105	1
7	1,227	18
8	0,765	8
9	1,139	11
10	1,003	12
11	0,812	8
12	0,807	8
13	1,376	35
14	1,286	9
15	0,785	18
16	1,239	25
17	0,865	1
18	0,974	4
19	1,467	46
20	1,284	2
21	1,139	1
22	0,974	63
23	1,022	27
24	1,768	216
25	1,295	132
26	1,401	34
27	1,306	180
28	1,346	110
29	0,833	7
30	0,955	12
31	0,901	2



$$r = 0,572836 \quad (P = 0,004)$$

Figura 1. Análisis de regresión entre carga parasitaria de *A. perfoliata* y D.O. por ELISA con antígeno crudo E/S.
(N = 31)

4.3.4. ANEXO II. RESULTADOS NO PUBLICADOS DEL INMUNODIAGNÓSTICO.- PROTEÓMICA

Como complemento del diagnóstico inmunológico, a la vista de los resultados del inmunoblot donde se comprobó la existencia de componentes de bajo peso molecular con inmunoreactividad genérica en los antígenos E/S de *A. perfoliata* y somáticos de *A. perfoliata* y *A. magna*, se seleccionaron los antígenos somáticos de ambas especies con el objetivo de realizar una búsqueda de péptidos específicos de especie potencialmente inductores de inmunoreactividad.

Se seleccionaron, por cuantificación proteica usando la técnica colorimétrica de Bradford (BioRad), cuatro muestras de antígeno somático, dos de *A. magna* (AM som y AM10) y dos de *A. perfoliata* (AP som y AP10) que fueron enviadas a la Unidad de Proteómica (Fundación Parque Científico de Madrid) de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE) según las condiciones descritas en el informe adjunto (IN-114330072). En cada una de las muestras, se recortó el gel a la altura de la banda correspondiente a la región de 10-12 kDa (Fig. 1) y se procedió a la digestión con tripsina de dichas bandas según se describe en el informe. Los péptidos digeridos fueron separados por cromatografía de fase reversa (nano-HPLC) en gradiente de acetonitrilo (ver informe) y la muestra así fraccionada fue depositada en una placa de MALDI TOF/TOF (Applied Biosystem 4800 plus) para el análisis de espectrometría de masas (MS).

De los espectros obtenidos, se seleccionaron como precursores un máximo de diez picos por fracción con una señal/ruido mínima de 50. La obtención de secuencias e identificación de proteínas se realizó mediante el software Protein Pilot v3.0 con el algoritmo Paragon como motor de búsqueda sobre una base de datos generada por selección taxonómica de *Taenia* en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (1722 proteínas). Para el análisis de secuencias se seleccionaron los precursores no compartidos entre las muestras de *A. magna* y *A. perfoliata* y se confirmaron manualmente las secuencias de los péptidos.

Los resultados de dicha selección se muestran en las tablas 1 y 2. En la comparación entre la muestras AM som y AP som se detectaron 28 péptidos presentes en la muestra de *A. magna* y ausentes en *A. perfoliata*, de los que 19 eran

secuencias identificadas en la base de datos de *Taenia* (Tabla 1) y 28 péptidos presentes en *A. perfoliata* y ausentes en *A. magna*, 21 de los cuales eran secuencias identificadas en la base de datos de *Taenia* (Tabla 2). De los 28 péptidos detectados en *A. magna* som, nueve fueron compartidos por las dos muestras de antígeno de dicha especie (Tabla 1). Entre ellos, cabe destacar el péptido equivalente a la proteína identificada como *14-kDa diagnostic antigen* de *Taenia solium* por su potencial capacidad inmunoreactiva en la identificación específica de *A. magna*.

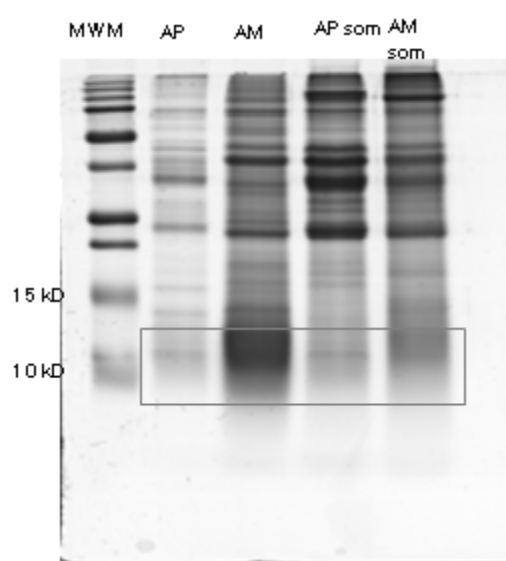



Figura 1. Imagen del gel teñido con coomasie coloidal, donde se señala la región a recortar a la altura de la banda de 10-12 kDa.

Tabla 1. Péptidos detectados en la muestra AM som ausentes en AP som. En azul se señalan los péptidos compartidos en las muestras AM y ausentes en AP.

Prec m/z	Prot N	Best Sequence	Protein
831.4859	2	STELLIR	Histone H3a
1349.699	2	EIAQDFKTDLR	Histone H3a
1363.719	2	EIAQDFKTDLR	Histone H3a
1261.713	3	LAKPATYEQIK	G3PDH
1282.61	4	NFGSYVTHETK	Neuronal nitric oxide synthase inhibitor
1402.6639	4	YGPTWHCIVGR	Neuronal nitric oxide synthase inhibitor
2155.0161	5	NMSQVINTIMQLGTECQR	calponin-like protein
816.4474		ELQTAVR	
830.4454		KLEVADR	cell division cycle 37-like protein
832.461		QPFDLGR	
839.4329		MGSPYLR	
845.49		GKLMLKR	RNA polymerase II
866.4714		LAQFLMK	
961.4893		ELLHFMR	
989.5651		VMERMAPR	putative proteasome maturation protein
1063.5129		FFHEDALGK	14-kDa diagnostic antigen
1141.545		ATYQILGYGR	activated oncosphere TSO45-2A
1149.579		ESDLADMKLK	H17g protein, tegumental antigen
1180.614		LGSLLYETR	
1192.682		AHAIALAEAVVK	high voltage-gated calcium channel beta subunit
1277.665		KESYALYLYK	Histone H2B
1305.626		IRSTQENEDGR	
1340.7271		TPHYVGLGDLR	
1433.7791		GVVATGDRTVMGR	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
1492.78		QRQLKKEQEEH	
1500.719		LYGTWKTGSTMKK	ribosomal protein L4
1524.746		FALPSWGYDAELR	
1537.795		YLAQLQEMVELGK	
2029.083		VGVGLLQSFSDDLKLIVK	NADH dehydrogenase subunit 1
2045.962		GATRWCSQPIYSQLK	dendritic cell-derived ubiquitin
2261.0969		FKPKNIVEEMRTALDDVQK	

Tabla 2. Péptidos detectados en la muestra AP som ausentes en AM som.

Prec m/z	Prot N	Best Sequence	Protein
1469.666	1	QEYDESGPGIVHR	Actin
1486.703	1	QEYDESGPGIVHR	Actin
1515.7469	1	DDAPRAVFPSIVGR	Actin
1918.995	1	KSYELPDGQVITIGNER	Actin
1954.068	1	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	Actin
1148.626	2	AGIALNDTFVK	G3PDH
1320.672	2	MKPQVGINGFGR	G3PDH
1528.803	2	VPTPNVSVVDLTCK	G3PDH
1831.98	2	FRVPTPNVSVVDLTCK	G3PDH
1352.5699	3	QSYDMQELAER	Oncosphere protein
1368.576	3	QSYDMQELAER	Oncosphere protein
1693.8879	5	YAPSIPKENFTALSR	Malato deshidrogenasa
979.4901		SRVTFQLK	Miosina
1133.528		GEEGTRELSR	
1183.516		VKYYIQVNR	Miosina
1201.604		ASWGVIVSINR	
1210.588		GASQSGMAMGAAR	Calponin-like
1291.6591		GKEFNLENAIR	RNA polimerasa II
1401.722		HQVEFLLLFH	
1461.7581		AVSDSDVAGITVSK	
1509.692		QATQESAYGNQANK	
1549.8879		TGWGPPEGYYGLPR	
1658.8199		LYLVDQKAKEIIPK	ectodermal neural cortex protein
1700.817		EFIEGMSQFSVKGNK	calcineurin B
1739.021		RLEDTWRTHTVNALK	thyroid hormone receptor interactor 10
1882.942		VNVLADALKSINNAERR	ribosomal protein S15a
1906.912		ADANELVATTHAVLARVR	
1963.9399		GQEDLNMTVMKQLGEVR	cysticercosis-specific antigen

	INFORME DE RESULTADOS		Código IN-114330072	Edición 1
	Análisis de bandas por LC-MS		Página 1 de 4	

DATOS DEL SOLICITANTE


Nombre y apellidos	Alejandro Bohórquez				
Departamento					
Centro / Entidad	Fac. De Veterinaria		UCM		
Dirección					
Localidad	Madrid		Código postal		
Teléfono		Fax		E-mail	alejandrobhornez@vet.ucm.es
Investigador principal / Responsable	Aránzazu Meana Mañes				

DATOS DE LA MUESTRA

Fecha de entrada	06/05/11	¿Sigue algún acuerdo o convenio?	no
Identificación de las muestras	AP10, AM10, AP som, AM som		
Nº de solicitud de servicio	114330072		
Fecha de realización de trabajos	02/09/11		

DATOS DEL INFORME

Código / edición:	IN-114330072 / 1
Fecha de salida:	02/09/11
Documentos adjuntos al informe	

 PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID	INFORME DE RESULTADOS	Código IN-114330072	Edición 1
	Análisis de bandas por LC-MS	Página 2 de 4	

ESQUEMA DE TRABAJO

1.- PREPARACIÓN DE MUESTRA Y ELECTROFORESIS

2.- DIGESTION Y LC

3.- ANALISIS MS Y RESULTADOS

Persona que realiza el trabajo


Felipe Clemente

Unidad de Proteómica

Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
Pza Ramón y Cajal s/n
28040 Madrid

Fundación Parque Científico de Madrid

Campus de Cantoblanco
Pabellón C, planta 1º
Carretera de Colmenar Viejo, km 15
28043 Madrid

	INFORME DE RESULTADOS	Código IN-114330072	Edición 1
	Análisis de bandas por LC-MS	Página 3 de 4	

1.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ELECTROFORESIS

Se utilizan las muestras: AP10, AM10, AP som y AM som para realizar un SDS-PAGE con 10 ug de proteína de cada una. Las muestras se tratan con buffer de carga durante 5 minutos a 90° C para reducir los puentes disulfuro e inmediatamente después se enfrían a 4° C otros 5 minutos.

Cada muestra se aplica en un pocillo de un gel SDS de acrilamida al 12 % (2,6% de bis acrilamida), aplicandose 100 voltios en laemmli buffer hasta que el frente alcanza el final del gel. A continuación el gel se fija y se tiñe con coomasie coloidal. En la figura 1 se encuentra la imagen del gel obtenido.

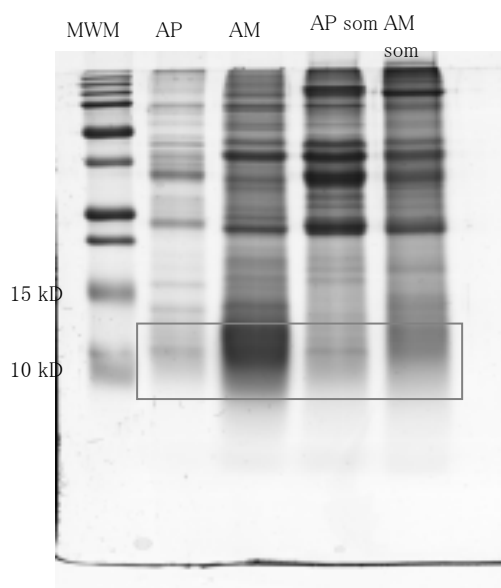



Figura 1. Imagen del gel teñido con coomasie coloidal

	INFORME DE RESULTADOS	Código IN-114330072	Edición 1
	Análisis de bandas por LC-MS	Página 4 de 4	

2.- DIGESTION Y LC

Se recortó del gel la zona marcada en la imagen de la figura 1 para cada muestra (entre 10 y 12 kD), tras trocear cada banda se procedió a la digestión.

Los puentes disulfuro se redujeron con 15 ul de DTT 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM (30 minutos a 64° C), y las cisteinas se bloquearon con 15 ul de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 25 mM (15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad). La digestión se realizó con 10 ul de tripsina bovina 12,5 ng/ul durante toda la noche a 37° C.

La mezcla de péptidos obtenida se aplicó en un nano-HPLC en gradiente de acetonitrilo (del 2% al 70% en 90 minutos) realizando la separación con una columna de fase reversa (C18, 3 um, 100 A. 75 um x 15 cm). La muestra así fraccionada se depositó sobre una placa de MALDI TOF/TOF al tiempo que se añadía la matriz apropiada (ácido alfa-ciano, 4 hidroxicinámico).

3.- ANALISIS MS Y RESULTADOS

Los espectros se obtuvieron en un MALDI TOF/TOF (Applied Biosystem 4800 plus), seleccionando como precursores un máximo de diez picos por fracción con una señal/ruido mínima de 50. La obtención de secuencias e identificación de proteínas se realizó utilizando el software Protein Pilot v3.0 con el algoritmo paragon como motor de búsqueda sobre una base de datos generada por selección taxonómica de Taenia en NCBI (1722 proteínas). Los resultados de las identificaciones se recogen en las distintas hojas excel del libro "identificaciones.xls" adjunto.

Para el análisis de secuencias se seleccionaron los precursores no compartidos entre las distintas muestras según la tabla de picos "peaklistLCMS.xlsx" adjunta, y se confirmaron manualmente las secuencias de los péptidos. La presencia o ausencia de las distintas secuencias se recogen en la hoja "precursores LCMS.xls". El resumen de péptidos no compartidos se recoge en la presentación: "Comparacion AP vs AM.ppt"

5. DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

Pese a sus diversas limitaciones, en la mayoría de laboratorios de diagnóstico la coprología sigue siendo una técnica rutinaria de detección de muchas parasitosis, dada la posibilidad de detección directa y en tiempo real de los agentes y su bajo coste. En el caso de las cestodosis equinas, los métodos coprológicos modificados han alcanzado una sensibilidad aceptable, si bien, como contrapartida, requieren de tiempos prolongados (Nielsen, 2015). Posiblemente su principal limitación sea la dificultad de establecer un diagnóstico diferencial entre las dos principales especies de cestodos: *A. perfoliata* y *A. magna*, dada la similitud morfológica entre los huevos de ambas especies.

Uno de los resultados obtenidos en estas investigaciones y presentados en esta memoria de tesis doctoral es que la coprología como método diagnóstico resulta significativamente más sensible para la detección de *A. magna* que *A. perfoliata*. Entre los posibles factores que podrían influir en la sensibilidad de la coprología se encuentra la carga parasitaria. A este respecto, varios autores han reseñado un incremento en la sensibilidad en muestras de caballos parasitados con más de 20 cestodos (Proudman y Edwards, 1992; Kjaer *et al.*, 2007). Otro factor que podría interferir en el estudio de la sensibilidad de la coprología es el estado de inmadurez/madurez de los cestodos. No obstante, el posible sesgo atribuible a dichos factores fue descartado en nuestro estudio. Por un lado, en los animales que resultaron positivos por coprología predominaron las cargas parasitarias bajas (1 – 30 cestodos) en ambas especies de *Anoplocephala*, por lo que las diferencias no podrían atribuirse a una mayor intensidad de parasitación por *A. magna* que por *A. perfoliata*. Por otra parte, las diferencias observadas en la sensibilidad de detección de cada especie fueron más evidentes cuando se analizaron exclusivamente caballos con cestodos maduros o con cestodos grávidos, por lo que la posible ausencia de eliminación fecal de huevos debida a la inmadurez de los cestodos fue también descartada. Una posible explicación a la mayor sensibilidad de la coprología en la detección de *A. magna* podría ser el mayor tamaño de esta especie, cuyo largo estróbilo se compone de anchos proglotis que se desprenden en grupos cuando alcanzan el estado de gravidez, mientras que el estróbilo de *A. perfoliata* es

mucho más corto y sus proglotis alcanzan el estado de gravidez a menor velocidad y, posiblemente, su ritmo de desprendimiento sea menor.

En este mismo estudio hemos podido evidenciar la mayor presencia de *A. magna* en caballos jóvenes (≤ 2 años), hasta el punto de que el 90% de las infecciones simples por *A. magna* se detectaron en este grupo de animales. El resto de animales parasitados por *A. magna* en infección simple fueron tres yeguas adultas, de las que una se hallaba gestante y otra había parido recientemente. Esta influencia de la edad del hospedador en el parasitismo ha sido ya denunciada en otros cestodos anoplocefálidos, como es el caso de la infección por *Moniezia* spp. en el ganado vacuno, típicamente asociada a terneros en su primer año (Ramajo Martín y Muro, 1999), y podría estar relacionada con el estado inmunitario del hospedador. Aunque son necesarios los estudios al respecto, el hallazgo de *A. magna* en animales jóvenes y en yeguas preñadas o recién paridas podría estar asociado a factores inmunitarios relacionados con la inmadurez o la preñez. No se detectó, por el contrario, influencia de la edad en la infección por *A. perfoliata*, ni influencia del sexo del hospedador en la infección por ninguna de las dos especies.

Estos dos resultados, i.e. la mayor sensibilidad de la coprología en la detección de *A. magna* y la marcada preferencia de esta especie por los animales jóvenes, pueden significar que los estudios epidemiológicos basados exclusivamente en el análisis coprológico probablemente hayan sobreestimado la prevalencia de *A. perfoliata* en zonas donde coexisten las dos especies y particularmente cuando en los muestreos se incluyen animales jóvenes. La razón de ello es la marcada similitud morfológica entre los huevos de ambas especies, lo que explicaría también, en parte, la gran variabilidad denunciada en la sensibilidad de los métodos coprológicos mejorados (40% a 62%, Gasser *et al.*, 2005; hasta 75%, Rebhein *et al.*, 2011).

Puesto que los programas de control con base epidemiológica deben fundamentarse en métodos de diagnóstico específicos, en estos estudios buscamos alternativas como la diferenciación morfológica de los huevos o su identificación por técnicas moleculares.

A pesar de la similitud morfológica entre los huevos de ambas especies (Soulsby, 1987; French y Chapman, 1992; Tarazona Vilas, 1999; Gasser *et al.*,

2005), en nuestro estudio hemos aportado un análisis morfométrico que ofrece mediciones diferenciadoras entre las dos *Anoplocephala* spp. tanto en el diámetro de la oncosfera como en la bisectriz mayor de la cubierta, resultando ambas medidas mayores para *A. perfoliata* que para *A. magna*. La diferencia en la bisectriz mayor de la cubierta es acorde con lo indicado por Soulsby (1987), pero difiere de Tarazona Vilas (1999), que informa de un tamaño similar o mayor en los huevos de *A. magna* que en *A. perfoliata*. En cuanto al diámetro de la oncosfera, nuestros resultados son congruentes con los aportados por Tarazona Vilas (1999), aunque las medidas indicadas por este autor para la oncosfera de *A. magna* son menores.

De acuerdo con el análisis morfométrico de este estudio, se asignaron dos puntos de corte, una para el diámetro de la oncosfera (15 μm) y otro para la bisectriz mayor de la cubierta (70 μm), para diferenciar con gran precisión los huevos de *A. magna* y *A. perfoliata*, especialmente con el diámetro de la oncosfera. Este análisis puede tener gran aplicación diagnóstica, ya que hasta el momento no se contaba con la posibilidad de diferenciar claramente los huevos de ambas especies.

Para discriminar entre las dos especies de *Anoplocephala*, el uso de estos dos parámetros morfométricos permite la identificación morfológica de estas dos especies y, por tanto, solventa los problemas de inespecificidad de la coprología. Por lo tanto, proponemos este método como especialmente útil en el diagnóstico de cestodosis en équidos jóvenes criados en países como España o Estados Unidos donde la coexistencia de ambas especies ha sido demostrada (Lichtenfels, 1975; Chapman *et al.*, 2002; Meana *et al.*, 2002, 2005).

Otra alternativa para la identificación específica de los huevos obtenidos en las coprologías es la identificación molecular. La mayoría de las técnicas moleculares introducidas en los diagnósticos de enfermedades parasitarias ha permitido detectar una gran diversidad genética en dichas poblaciones parasitarias, especialmente en relación con los marcadores de ADN ribosomal (ADNr). A este respecto, los espaciadores de transcripción interna (ITS) del ADNr han sido objeto de muchas investigaciones para la detección de variaciones inter- e intraespecíficas de varios grupos de cestodos (Bowles *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997; Verneau *et al.*, 1997; Van Herwerden *et al.*, 1998; Van Herwerden *et al.*,

2000; Zehnder and de Chambrier, 2000; Drogemuller *et al.*, 2004). Con anterioridad al desarrollo del trabajo presentado en esta memoria, se habían diseñado cebadores específicos para la amplificación por PCR de la región ITS-2 del ADNr de *A. perfoliata* (Drogemuller *et al.*, 2004). El trabajo aquí presentado se realizó al objeto de diseñar una PCR múltiple para la detección específica y simultánea de las tres especies de cestodos parásitos de équidos.

Así, a partir de la información publicada para *A. perfoliata*, *A. mamillana* y de las nuevas secuencias de ADN obtenidas en nuestro trabajo para *A. magna*, se comprobó una alta similitud en sus regiones 18S, 5.8S y 28S del ADNr, mientras que se observó una gran variabilidad en la región ITS-2 -cabe reseñar las dificultades de alineación encontradas con una secuencia disponible en GenBank (AY752646) de un ejemplar de *A. perfoliata*, dada su mayor similitud con las secuencias obtenidas para *A. magna*, lo que indica que la información proporcionada por GenBank debería ser contrastada-. Consiguientemente se seleccionó la región ITS-2 de ADNr para el diseño de nuevos cebadores específicos para *A. magna* y *A. mamillana*, al objeto de poner a punto una PCR múltiple en combinación con los cebadores previamente publicados para la detección de *A. perfoliata* (Drogemuller *et al.*, 2004). Los amplicones producidos por los respectivos cebadores de *A. perfoliata* (250 pb), *A. magna* (382 pb) y *A. mamillana* (450 pb) en la PCR múltiple permitieron la diferenciación entre las tres especies, tanto a partir de ADN procedente de ejemplares adultos como de huevos.

La especificidad de los cebadores diseñados por Drogemuller *et al.* (2004) en la detección de *A. perfoliata* ya había sido contrastada por estos mismos autores frente a *A. mamillana* y diversas especies de nematodos de la subfamilia Cyatostominae, así como frente a otros nematodos (*Oxyuris equi*, Cyathostominae, *Habronema* spp.) y larvas de *Gasterophilus* spp. por Traversa *et al.* (2008). Los resultados obtenidos en nuestro estudio con dichos cebadores confirman la ausencia de amplificación cruzada con *A. mamillana* y demuestran la ausencia de productos de amplificación cruzada con *A. magna*, lo que valida la utilidad de dichos cebadores en el diagnóstico específico de *A. perfoliata*. Con la adición de los nuevos cebadores diseñados para *A. magna* y *A. mamillana*, la PCR múltiple permite la detección simultánea y específica de las tres especies de cestodos

parásitas de los équidos. Al igual que con los cebadores de *A. perfoliata*, la especificidad de los nuevos cebadores ha sido también contrastada frente a otros helmintos y artrópodos.

Respecto a la sensibilidad de la PCR múltiple diseñada, la máxima dilución de control positivo de ADN genómico capaz de rendir productos específicos de las tres especies fue de 0,7 nanogramos por microlitro (0,7 ng/μl), mientras que la siguiente dilución (0,14 ng/μl) sólo lo fue para *A. magna* y *A. mamillana* y la siguiente (0,007 ng/μl) no sirvió para detectar ninguna especie. El límite de detección aquí alcanzado para *A. perfoliata* (0,7 ng/μl) es mayor que el de 0,005 ng/μl obtenido con la PCR simple diseñada por Drogemuller *et al.* (2004), por lo que la PCR múltiple resulta comparativamente menos sensible que la simple en la detección de ADN genómico de *A. perfoliata*.

Al igual que se observó con el ADN genómico del cestodo adulto, la sensibilidad de la PCR múltiple para la detección de huevos del parásito fue mayor *A. magna* que en *A. perfoliata*, tanto en la identificación de ADN genómico de huevos incluidos en solución pura (10 huevos/2 μl en *A. perfoliata* vs 1 huevo/2 μl en *A. magna*) como de huevos mezclados con sedimento fecal (50 huevos/5 g heces en *A. perfoliata* vs 10 huevos/5 g heces en *A. magna*). Esta menor sensibilidad de detección de *A. perfoliata* que de *A. magna* ya había sido también constatada en nuestro estudio con el método coprológico mejorado de Meana *et al.* (1998) (Bohórquez *et al.*, 2014).

Nuestros resultados de sensibilidad de detección de huevos en heces mediante la PCR múltiple no son comparables con los de Drogemuller *et al.* (2004), dado que los autores no evaluaron la detección de huevos en heces, sino de restos de cestodo adulto, obteniendo un límite de detección de 6 mg de cestodo por gramo de heces. Con posterioridad, dicha PCR simple fue contrastada con la técnica coprológica mejorada de Proudman y Edwards (1992) en un estudio de campo en équidos con infección natural por *A. perfoliata*, obteniéndose por PCR una detección sólo ligeramente superior a la de la coprología (Traversa *et al.*, 2008). Si bien la ausencia de análisis *post-mortem* impidió evaluar sensibilidad real de ambos métodos, la cantidad de heces a procesar para analizar por PCR fue de 10 g,

frente a los 40 g analizados por coprología, por lo que cabe atribuir a la PCR una mayor eficacia relativa.

A expensas de realizar estudios de campo que permitan evaluar la sensibilidad real de la PCR múltiple, el método propuesto debería facilitar el diagnóstico específico de las cestodosis equinas, especialmente en áreas donde existe la coinfección por ambas *Anoplocephala* spp. Como comentaremos a continuación, el hecho de que el diagnóstico serológico pueda conducir a un diagnóstico erróneo de *A. perfoliata* en infecciones por *A. magna* (Bohórquez *et al.*, 2012) podría explicar en parte por qué la relación entre el síndrome cólico y la detección serológica de *A. perfoliata* no se ha demostrado por unanimidad. La aplicación de esta PCR múltiple en el diagnóstico rutinario en animales que sufren perturbaciones digestivas permitiría la rápida detección de la infección por cualquiera de las tres especies de cestodos que afectan a los équidos, facilitando por tanto el diagnóstico etiológico. A su vez, desde un punto de vista científico, la aplicación de esta técnica al diagnóstico de *A. perfoliata* aclararía en gran medida el espectro de las repercusiones patológicas de este cestodo.

La utilización de forma frecuente de métodos indirectos de diagnóstico de la infección por *A. perfoliata* y la existencia de un claro debate para relacionar estas determinaciones con la responsabilidad de este parásito con la aparición de cólicos induce a sospechar que los métodos de diagnóstico inmunológico actuales pueden no ser específicos.

Los métodos actuales de detección de la infección por *A. perfoliata* se basan en la utilización de la fracción de 12/13 kDa del antígeno E/S del cestodo (Proudman y Trees, 1996b), cuya especificidad se fundamenta en la ausencia de reactividad cruzada con proteínas antigénicas de *A. mamillana* y de otros helmintos (nematodos Strongylidae, *Parascaris equorum*, *Echinococcus granulosus*, *Taenia multiceps*) (Proudman and Trees, 1996a,b). Los resultados de nuestro estudio con el antígeno crudo E/S de *A. perfoliata* corroboran la especificidad de la fracción de 12/13 kDa en lo que a nematodos respecta (*P. equorum*, *Strongylus* y Cyatostomimae) y constatan también su especificidad frente a artrópodos (*Gasterophilus intestinalis*), puesto que no se detectó reactividad frente a este

componente antigénico en sueros de animales parasitados con las mencionadas especies de nematodos o artrópodos y negativos a cestodos.

Sin embargo, hasta el desarrollo de nuestro estudio, ni el antígeno crudo E/S de *A. perfoliata* ni la proteína purificada de 12/13 kDa habían sido enfrentados a sueros de caballos parasitados por *A. magna*. El resultado más relevante de nuestro estudio de inmunodiagnóstico es que la región de 12- 14 kDa del antígeno crudo E/S de *A. perfoliata* es reconocida tanto por sueros de caballos parasitados por *A. perfoliata* como por *A. magna*, indicando la existencia de reactividad cruzada entre los antígenos de ambos parásitos a ese nivel. Estos resultados han sido posteriormente reforzados por nuestros análisis complementarios por ELISA con antígeno purificado de 12/13 kDa y con antígeno crudo E/S de *A. perfoliata*, donde se muestra una nula capacidad de dichos antígenos en la distinción entre ambas especies.

Se han descrito otros componentes antigénicos de *A. perfoliata* en la bibliografía. Höglund *et al.* (1995) caracterizaron un antígeno crudo somático a partir del escólex de *A. perfoliata*, cuyas bandas más prominentes se encontraban en los rangos de 31 a 45 kDa y de 66 a 200 kDa de peso molecular. Mediante inmunoblot, los autores analizaron dicho antígeno enfrentándolo con sueros de caballos parasitados por *A. perfoliata* y con distintos niveles de lesión intestinal y observaron un patrón heterogéneo de bandas dentro del rango de 50 a 70 kDa. Según dicho patrón, las bandas principales fueron detectadas en las regiones de 66 y 70 kDa en sueros de animales positivos a *A. perfoliata* y no en sueros de animales negativos y sin lesiones intestinales. En un estudio posterior, los autores detectaron un patrón de bandas en las regiones de 10, 35, 45 y 66 kDa dependiendo del tiempo transcurrido desde la infección (Höglund *et al.*, 1998). Nuestros resultados de caracterización de un antígeno somático homólogo de *A. perfoliata* revelaron un patrón de reconocimiento más amplio que el descrito por Höglund *et al.* (1995) en las regiones de bajo peso molecular, detectándose bandas de 23 kDa y 10/ 11 kDa. En cuanto al inmunoblot, en contraste con el patrón descrito por los mencionados autores (Höglund *et al.*, 1995), no se detectaron en nuestro estudio diferencias entre sueros de caballos positivos y negativos a cestodos en pesos moleculares superiores a 20 kDa, mientras que en niveles

inferiores se detectó una región en el rango de 10 - 14 kDa sólo presente en sueros de caballos positivos a cestodos. Si bien, una vez más, como en el caso del antígeno E/S este componente inmunogénico fue reconocido tanto por sueros homólogos (*A.perfoliata*-positivos) como heterólogos (*A.magna*-positivos) indicando nuevamente una reactividad cruzada entre los antígenos somáticos de ambos parásitos a ese nivel.

Otra de las aportaciones del presente estudio es la descripción por vez primera de la composición antigénica de *A. magna*. El patrón de proteínas del antígeno de E/S de *A. magna* difirió principalmente del homólogo de *A. perfoliata* en la ausencia de bandas en *A. magna* en el rango de 23 - 40 kDa. Por su parte, el antígeno somático de *A. magna* difirió de su homólogo en *A. perfoliata* en la presencia en *A. magna* de dos bandas de 18 y 14 kDa. Sin embargo, contrariamente a lo esperado según estos resultados de caracterización por electroforesis, no se observó por inmunoblot reacción aparente del antígeno de E/S de *A. magna* en los niveles de bajo peso molecular con sueros homólogos ni heterólogos. No obstante, éste no fue el único caso en nuestro estudio, puesto que los cuatro antígenos mostraron algunas bandas visibles por electroforesis y aparentemente ausentes después por inmunoblot, y viceversa. La ausencia aparente de bandas de bajo peso molecular en el antígeno E/S de *A. magna* por inmunoblot parece indicar una débil reactividad de esos componentes frente a sueros positivos a *Anoplocephala*, aunque no deberían descartarse otras posibilidades, como por ejemplo la presencia de alguna sustancia inhibidora en el antígeno obtenido por nosotros. En cuanto al antígeno somático de *A. magna*, el inmunoblot reveló reactividad de en la región de 10 -14 kDa frente a sueros homólogos (*A. magna*-positivos) y heterólogos (*A. perfoliata*-positivos), mostrando así reactividad de género, pero no de especie.

Diferentes estudios han evaluado la utilidad diagnóstica del ELISA con el antígeno E/S de 12/13 kDa de *A. perfoliata* para la detección sérica de anticuerpos específicos del tipo IgG (T). Proudman y Trees (1996b) encontraron una correlación estadística entre los niveles de anticuerpos específicos y la intensidad de infección, proponiéndola como una medida diagnóstica útil del riesgo de cólico asociado a *A. perfoliata*. Sin embargo esta asociación no pudo ser reproducida por otros autores

(Kjaer *et al.*, 2007, Skotarek *et al.*, 2010), aunque algunos establecieron un punto de corte de densidad óptica con utilidad diagnóstica para determinar qué caballos deben ser tratados frente a *A. perfoliata* (Kjaer *et al.*, 2007). En diferentes trabajos se han observado variaciones considerables en los niveles de densidad óptica por ELISA entre caballos con intensidades similares de parasitación (Höglund *et al.*, 1995; Proudman y Trees, 1996a). No obstante, se ha reseñado la detección de un patrón estacional en los niveles de anticuerpos cuya subida reflejaría las épocas de infección (Höglund *et al.*, 1995, 1998). En cuanto a los resultados de nuestros análisis por inmunoblot, no se detectó relación aparente entre la intensidad de parasitación y la reactividad de los sueros, tanto en el caso de *A. perfoliata* (uno de los caballos con mayores cargas parasitarias tuvo el suero menos reactivo) como de *A. magna* (uno de los sueros reactivos provenía de un caballo con sólo cuatro cestodos). Sin embargo nuestras observaciones no están necesariamente en desacuerdo con las de Proudman y Trees (1996b), dado que el inmunoblot no es un método cuantitativo y no permite establecer correlaciones claras. De hecho, tal como se muestra en el “Anexo del diagnóstico inmunológico”, a pesar de la gran variabilidad en las densidades ópticas obtenidas con el ELISA con antígeno E/S crudo de *A. perfoliata* entre animales con cargas similares de parasitación, se detectó una correlación estadística moderada ($r = 0,57$; $P < 0,05$) entre carga parasitaria y reactividad de los sueros. No podemos ofrecer una explicación simple para la variable reactividad detectada entre sueros de caballos con similares intensidades de infección. Por ejemplo, la baja reactividad observada en uno de los équidos con mayores cargas parasitarias de *A. perfoliata* (138 cestodos) frente a los antígenos homólogos no se puede atribuir fácilmente a una infección recientemente adquirida, dado que dicho animal fue sacrificado a finales de marzo, momento en que la infección por esta especie está generalmente bien establecida (Meana *et al.*, 2005). Posiblemente, entre otros factores, la variabilidad individual en la respuesta inmunitaria (Höglund *et al.*, 1995; Proudman y Trees, 1996a, b; Traversa *et al.*, 2008) haya podido influir en las diferencias detectadas entre sueros homólogos en nuestro estudio.

Como conclusión, los resultados de este estudio inmunológico indican la existencia de componentes inmunoreactivos de bajo peso molecular en los antígenos crudos E/S y somático de *A. perfoliata* y somático de *A. magna* que son

reconocidos por sueros positivos a *Anoplocephala* a nivel genérico, pero no específico. A la vista de estos resultados, se desaconseja el uso de dichos antígenos en el diagnóstico diferencial entre las dos principales especies causantes de cestodosis equinas. Aunque estos resultados no indican directamente la existencia de reactividad cruzada en el componente purificado de 12/13 kDa del antígeno E/S de *A. perfoliata*, dado que no se ha analizado aún por inmunoblot frente a *A. magna*, es más que probable, dados los resultados mostrados en el Anexo, que los métodos de inmunodiagnóstico actuales basados en este componente no puedan diferenciar con precisión entre estas dos especies de cestodo, lo que conlleva un riesgo de diagnósticos erróneos de *A. perfoliata* en áreas donde *A. magna* está presente. En ausencia de antígenos específicos de especie, el diagnóstico diferencial debería basarse en métodos directos, bien a través de la identificación de huevos en heces a partir del diagnóstico coprológico o de la detección de fragmentos de ADN específicos a través de herramientas moleculares.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Primera

La coprología, como método diagnóstico, resulta significativamente más sensible en la detección de *A. magna* que de *A. perfoliata*, con independencia del grado de parasitación o del estado de madurez de los cestodos. Dada la similitud morfológica de los huevos de ambas especies y demostrada la frecuencia de la infección por *A. magna* en équidos jóvenes, menores de dos años, resulta imprescindible la identificación específica de la infección por cestodos en este grupo de animales.

Segunda

La identificación específica de la infección por cestodos puede realizarse de forma directa mediante técnicas coprológicas con posterior identificación de los huevos, bien por análisis morfométrico o por PCR. Por análisis morfométrico, los huevos de *A. perfoliata* son mayores que los de *A. magna*. Se asignan por primera vez dos puntos de corte (15 µm para el diámetro de la oncosfera y 70 µm para la bisectriz mayor de la cubierta), capaces de distinguir con gran precisión entre los huevos de ambas especies.

Tercera

El diagnóstico de las cestodosis equinas por técnicas directas puede realizarse con una nueva PCR múltiple utilizando dos nuevos pares de cebadores específicos para *A. magna* y *A. mamillana* basados en la región ITS-2 del ADNr, que en combinación con los ya diseñados para *A. perfoliata* permiten la detección simultánea y específica de las tres especies de cestodos parásitas de los équidos. Se ha comprobado por primera vez la especificidad frente a *A. magna* de los cebadores diseñados a partir de la región ITS-2 del ADNr por Drogemuller *et al.* (2004) para el diagnóstico de *A. perfoliata*, confirmándose su idoneidad en el diagnóstico diferencial de las cestodosis equinas.

Cuarta

La región de 12-14 kDa del antígeno crudo E/S de *A. perfoliata* es reconocida tanto por sueros de caballos parasitados por *A. perfoliata* como por *A. magna*, lo que indica la existencia de inmunidad cruzada entre los antígenos de ambos parásitos a ese nivel. Esto sugiere que los métodos actuales de detección basados en el uso del antígeno purificado de 12/13 kDa conllevan el riesgo de falsos diagnósticos de *A. perfoliata* en áreas donde coexisten las dos especies de cestodo.

Quinta

La composición antigénica de *A. magna* muestra componentes inmunoreactivos de bajo peso molecular en el antígeno somático, aparentemente no presentes en el antígeno E/S. Los componentes inmunoreactivos de bajo peso molecular de los antígenos crudos E/S y somático de *A. perfoliata* y somático de *A. magna* son reconocidos por sueros positivos a *Anoplocephala* a nivel genérico, pero no específico, lo que desaconseja su uso en el diagnóstico diferencial entre especies.

7. RESUMEN

7. RESUMEN

Las diferencias en patogenicidad y epidemiológicas entre las infecciones por *Anoplocephala perfoliata* y *A. magna* justifican la necesidad de diagnósticos diferenciales en países como España, donde la parasitación por *A. magna* en infección pura o mixta con *A. perfoliata* está demostrada.

Para evaluar la fiabilidad del diagnóstico coprológico en la detección de *A. perfoliata* en áreas donde coexiste la infección por *A. magna*, se analizó la sensibilidad del diagnóstico coprológico para cada una de las especies en caballos identificados por necropsia como positivos a *Anoplocephala* spp. en infección simple o mixta. Se analizó también la distribución de cada especie en función del sexo y de la edad de los caballos y se evaluó la fiabilidad de dos variables morfométricas (diámetro de la oncosfera y bisectriz mayor de la cubierta) en la diferenciación entre los huevos de ambas *Anoplocephala* spp. El estudio se llevó a cabo sobre 130 équidos identificados como positivos a la infección por *Anoplocephala* spp. por inspección visual *post-mortem*, utilizados como controles positivos.

En cuanto a la sensibilidad de la coprología, ésta resultó significativamente más sensible ($P < 0,01$) en la detección de *A. magna* que de *A. perfoliata*, tanto en el análisis global (55% vs 26%) como en el de équidos con cestodos maduros (75% vs 15%) o grávidos (79% vs 20%) y con independencia de la carga parasitaria, puesto que predominaron las intensidades bajas (<30 cestodos) en los équidos que resultaron positivos por coprología a una u otra especie. En relación con la distribución por edades, se detectó un claro predominio de la infección por *A. magna* en animales jóvenes (≤ 2 años) sobre los adultos (90% vs 10%; $P < 0,01$).

La mayor sensibilidad de la coprología en la detección de *A. magna* y la marcada preferencia de esta especie por los animales jóvenes implica que los estudios epidemiológicos basados en la coprología, probablemente sobreestimen la prevalencia de parasitación por *A. perfoliata*, dada la similitud morfológica de los huevos de ambas especies.

En relación con la identificación morfológica, los huevos de *A. perfoliata* mostraron mayores índices morfométricos que los de *A. magna*. El diámetro de la oncosfera fue de 15 – 25 μm ($x \pm \text{D.E.} = 17,78 \pm 1,28$) en *A. perfoliata*, frente a 10 –

17,5 μm ($x \pm \text{D.E.} = 12,21 \pm 1,34$) en *A. magna*. En el 100% de oncosferas de *A. perfoliata*, el diámetro fue $\geq 15 \mu\text{m}$, mientras que en el 97% de las de *A. magna* el diámetro fue $< 15 \mu\text{m}$. Según el análisis ROC, el umbral óptimo de distinción entre las oncosferas de ambas especies fue 15 μm . Con ese punto de corte, los huevos de *A. perfoliata* podrían distinguirse de los de *A. magna* con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97%. Se seleccionó en 70 μm el punto de corte óptimo para distinguir los huevos de *A. perfoliata* de los de *A. magna* con una sensibilidad de 98% y una especificidad de 84%. Con estos resultados, proponemos el uso de estos dos índices morfométricos (15 μm de diámetro de oncosfera y 70 μm de bisectriz mayor de cubierta) como puntos de corte en la distinción entre ambas especies, especialmente en équidos jóvenes, aparentemente propensos a la infección por *A. magna*, en áreas donde coexisten ambas especies.

Con el objetivo de tener otras alternativas en el diagnóstico diferencial entre las tres principales especies de cestodos de équidos, se ha diseñado un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección simultánea de *A. perfoliata*, *A. magna* y *A. mamillana*. Para ello hubo que diseñar dos nuevos pares de cebadores específicos para *A. magna* y *A. mamillana*. Los cebadores específicos de *A. mamillana* se diseñaron a partir de secuencias del ITS-2 del ADNr disponibles, mientras que en el caso de *A. magna*, el diseño requirió la secuenciación previa de varias regiones del ITS-2 para la detección de marcadores genéticos.

En cuanto a los resultados, todos los ensayos de PCR rindieron las secuencias de ADN (amplicones) deseadas (382 pb en *A. magna*, 430 pb en *A. mamillana* and 254 pb en *A. perfoliata*) cuando se probaron con muestras de ADN genómico aisladas de las respectivas especies, sin detectarse amplicones no deseables.

En los ensayos de amplificación individuales con cada par de cebadores, se comprobó la especificidad de los tres pares de cebadores con las tres especies de cestodos. Los dos nuevos cebadores para la detección de *A. magna* y *A. mamillana* mostraron una clara especificidad frente al resto de especies de cestodos. En ningún caso se detectaron productos de amplificación con los controles negativos y se demostró que el origen geográfico de los aislados no interfería con los

resultados. No se detectó amplificación cruzada con el ADN de otros parásitos (*G. intestinalis*, *P. equorum*, *S. vulgaris*).

En los ensayos de amplificación utilizando los tres pares de cebadores, la máxima dilución de control positivo de ADN genómico que rindió productos específicos de las tres especies fue 1/100 (0,7 ng/μl). La dilución anterior (1/500; 0,14 ng/μl) sólo sirvió para identificar *A. magna* y *A. mamillana*, pero no *A. perfoliata* y el resto de diluciones resultaron negativas para las tres especies.

En los análisis de sensibilidad con los cebadores específicos para *A. magna* y *A. perfoliata*, utilizando muestras fecales negativas contaminadas con 500 – 10 huevos de cada especie, la mínima cantidad detectable fue de 50 huevos para cada especie. Con las diluciones seriadas de ADN puro preparado a partir de 80 – 1 huevos de cada especie en 2 μl de solución de PCR, todas las diluciones rindieron productos de *A. magna*, mientras que la máxima dilución a la que se revelaron productos de *A. perfoliata* fue la obtenida a partir de 10 huevos. Todos los resultados fueron reproducibles.

Como conclusión, el método de PCR propuesto es capaz de diferenciar infecciones causadas por las dos especies de cestodos más frecuentes en los équidos, *A. perfoliata* y *A. magna*, en presencia de huevos en heces, así como de detectar infecciones mixtas por las tres especies.

Por último, ante la posibilidad de que los actuales métodos de inmunodiagnóstico de *A. perfoliata*, basados en el antígeno E/S purificado de 12/13 kDa, carezcan de especificidad, en el presente estudio se evalúa la especificidad de la fracción 12-14 kDa del antígeno E/S crudo en el diagnóstico diferencial con *A. magna*, y se obtienen y caracterizan nuevos antígenos E/S y somáticos, a fin de compararlos con los antígenos homólogos de *A. perfoliata* y determinar su utilidad potencial en el diagnóstico diferencial entre ambas especies.

Los resultados revelan que la región de 12 – 14 kDa del antígeno E/S crudo de *A. perfoliata* es reconocida tanto por sueros de caballos positivos a *A. perfoliata* como positivos a *A. magna*, lo que indica la existencia de reactividad cruzada entre los componentes inmunogénicos de ambas especies a este nivel.

En cuanto a la comparación del antígeno somático de *A. perfoliata* obtenido en nuestro estudio con el descrito por Hoglund *et al.* (1995), el análisis electroforético reveló un patrón más amplio en la región de bajo peso molecular, dada la detección de bandas de 23 kDa y 10/11 kDa. El inmunoblot reveló reactividad en la región de 10-14 kDa, sólo frente a sueros de animales positivos a cestodos, tanto homólogos (*A. perfoliata*) como heterólogos (*A. magna*), indicando reactividad cruzada entre los antígenos somáticos de ambos cestodos a ese nivel.

Los resultados de este estudio constituyen la primera descripción de la composición antigénica de *A. magna*. El patrón proteico del antígeno E/S de *A. magna* difirió fundamentalmente del de *A. perfoliata* en la ausencia de bandas en el rango de 26 – 40 kDa, y el antígeno somático, en la presencia de bandas en *A. magna* de 18 y 14 kDa, ausentes en *A. perfoliata*. Por inmunoblot, no se detectó reacción aparente en el antígeno E/S de *A. magna* frente a sueros homólogos ni heterólogos, mientras que el antígeno somático reveló reactividad en la región de 10 – 14 kDa, nuevamente de carácter genérico, no específico.

En resumen, los resultados del estudio revelan la existencia de componentes inmunoreactivos de bajo peso molecular en los antígenos crudos E/S y somático de *A. perfoliata* y somático de *A. magna* que son reconocidos por sueros de caballos positivos a *Anoplocephala* a nivel genérico, pero no específico. La reactividad cruzada entre esos componentes desaconseja su uso en el diagnóstico diferencial entre ambas *Anoplocephala* spp.

Como complemento del estudio de inmunodiagnóstico, se añaden dos anexos de resultados de análisis por ELISA y proteómica no publicados:

En el primero, se seleccionó un grupo de animales con infección conocida mediante necropsia (negativos a cestodos o con infección monoespecífica por *A. perfoliata*, monoespecífica por *A. magna* o mixta), para evaluar la utilidad práctica del antígeno E/S de *A. perfoliata* en el diagnóstico diferencial, a través de dos análisis: uno, mediante ELISA con el antígeno purificado de 12/13 kDa de *A. perfoliata* (Proudman y Trees, 1996b), realizado en un laboratorio de referencia, y otro mediante un ELISA elaborado en nuestro laboratorio frente al antígeno crudo E/S de *A. perfoliata* basado en el método descrito por Proudman y Trees, 1996a. Los resultados de dichos análisis mostraron una sensibilidad del 100% en la

detección de *A. perfoliata* por ambos ELISAs pero una nula especificidad en la distinción entre las dos *Anoplocephala* spp. Considerando la infección por *Anoplocephala* spp. de forma global, el ELISA con antígeno crudo E/S mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% en la detección de infecciones por cestodos. Por otra parte, se calculó el coeficiente de correlación (r) entre la carga parasitaria y la densidad óptica (D.O.) obtenida por ELISA con antígeno crudo E/S en un grupo de animales con infección pura por *A. perfoliata*, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,57 ($P < 0,05$).

El segundo anexo recoge el resultado de un análisis proteómico por espectrometría de masas realizado con los componentes de bajo peso molecular (10 - 12 kDa) de los antígenos somáticos de *A. perfoliata* y *A. magna* que habían mostrado reactividad genérica, con el objetivo de realizar una búsqueda de péptidos específicos de especie potencialmente inductores de inmunoreactividad. Dicho estudio fue realizado en la Unidad de Proteómica (Fundación Parque Científico de Madrid) de la Universidad Complutense de Madrid. Se detectaron 28 péptidos presentes en la muestra de *A. magna* y ausentes en *A. perfoliata*, de los que 19 eran secuencias identificadas en la base de datos de *Taenia* spp. y 28 péptidos presentes en *A. perfoliata* y ausentes en *A. magna*, 21 de los cuales eran secuencias identificadas en la base de datos de *Taenia* spp. Entre los péptidos detectados en *A. magna*, cabe destacar el equivalente a la proteína identificada como *14-kDa diagnostic antigen* de *Taenia solium* por su potencial capacidad inmunoreactiva en la identificación específica de *A. magna*.

8. SUMMARY

8. SUMMARY

Pathogenic and epidemiological differences between infections by *Anoplocephala perfoliata* and *A. magna* justify the necessity of differential diagnoses in countries like Spain where *A. magna* has been demonstrated in single or mixed infection with *A. perfoliata*.

In order to evaluate the reliability and accuracy of the copro-diagnosis in the detection of *A. perfoliata* in the presence of *A. magna*, the sensitivity of the copro-diagnosis of *A. perfoliata* and *A. magna* was examined in horses identified by necropsy as positive for *Anoplocephala* spp. as single or double infections. The distribution of each species according to the age and sex of the host was also examined. Finally, the reliability of two morphometric variables (major shell bisector length and oncosphere diameter) for the identification of eggs of both *Anoplocephala* species was assessed. The study was carried out on 130 equids, classified as positive for *Anoplocephala* spp. infection by *post-mortem* visual inspection, used as the reference standard.

Coprology was significantly more sensitive ($p < 0.01$) at detecting *A. magna* than *A. perfoliata*. This difference (55% vs 26%) was independent of the parasite burden and was greater when testing was limited to horses with mature (75% vs 15%) or gravid tapeworms (79% vs 20%). Any possible biases due to an immature tapeworm stage were ruled out since low burdens (< 30 cestodes) predominated over moderate (31 – 100 tapeworms) or high burdens in animals returning a positive coprology test. Another finding of this study was the preference shown by *A. magna* for young (≤ 2 years) horses. Thus, 90% of single infections by *A. magna* were detected in young animals *versus* 10% in adult animals. The higher coprological sensitivity detected towards *A. magna* and the strong preference shown by this species for young animals mean that past epidemiological studies have probably overestimated the prevalence of *A. perfoliata* in areas where both occur, especially those performed in young horses, given the morphological similarity of *Anoplocephala* spp. eggs.

The morphometric analysis revealed differences in the oncosphere diameter and major shell bisector length. In both cases, measurements were larger for *A. perfoliata* than *A. magna*. Oncosphere diameter was 15 - 25 μm ($x \pm \text{D.E.} = 17,78 \pm 1,28$) in *A. perfoliata*, *versus* 10 - 17,5 μm ($x \pm \text{D.E.} = 12,21 \pm 1,34$) in *A.*

magna. Oncosphere diameter was $\geq 15 \mu\text{m}$ in 100% of oncospheres of *A. perfoliata*, whereas it was $< 15 \mu\text{m}$ in 97% of those of *A. magna*. According to the ROC analysis, the optimal threshold to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs was a diameter of $15 \mu\text{m}$. Using this cut-off, eggs of *A. perfoliata* would be distinguished from *A. magna* with a sensitivity of 100% and specificity of 97%. In 98% of *A. perfoliata* eggs, shell bisectors were $\geq 70 \mu\text{m}$, whereas in 84% of *A. magna* eggs they were $< 70 \mu\text{m}$. According to the ROC analysis, $70 \mu\text{m}$ was selected as the optimal cut-off bisector length to distinguish between the eggs of *A. perfoliata* and *A. magna* with a sensitivity of 98% and specificity of 84%. According to those morphometric data, both cut-offs ($15 \mu\text{m}$ oncosphere diameter and $70 \mu\text{m}$ major shell bisector), were assigned to distinguish the eggs of *A. perfoliata* from those of *A. magna* with high accuracy, especially with the oncosphere diameter cut-off. We propose the use of these two morphometric data as cut-offs to distinguish between the two *Anoplocephala* spp., especially in young equids, apparently more prone to *A. magna* infections in areas where these two species co-exist.

In order to dispose of more options of differential diagnosis, a method based on the polymerase chain reaction (PCR) for the simultaneous detection of *A. perfoliata*, *A. magna* and *A. mamillana* was designed. Accordingly, the Internal transcribed spacer-2 (ITS-2) region of rDNA was selected to design two new pairs of specific primers for *A. magna* and *A. mamillana* which, in combination with previously published primers designed for the detection of *A. perfoliata* (Drogemuller *et al.*, 2004), could be used in a multiplex PCR. Specific primers for *A. mamillana* were designed from available ITS-2 sequences whereas the design of primers for *A. magna* required the previous sequencing of several ITS-2 regions for the detection of genetic markers.

All the PCR assays yielded the expected DNA sequences (amplicons) (382 bp for *A. magna*, 430 bp for *A. mamillana* and 250 bp for *A. perfoliata*) when tested on genomic DNA samples isolated from the respective species, and no undesirable amplicons were detected by capillary electrophoresis. The specificity of the three pair of primers was demonstrated for each three tapeworm species. No amplicons were detected with negative controls. The geographic origin of the isolates did not interfere with the results. No cross reactivity was detected against the DNA of other parasites (*G. intestinalis*, *P. equorum*, *S. vulgaris*).

When conducting PCR amplification using the three primer pairs, 1/100 (0,7 ng/μl) was the maximum dilution of positive control genomic DNA found to render specific products of the three species. The next dilution (1/500; 0,14 ng/μl) only served to identify *A. magna* and *A. mamillana* but not *A. perfoliata*. Further dilutions proved negative for all three species.

When testing the PCR sensitivity using the primers specific for *A. magna* and *A. perfoliata* on fecal samples spiked with 500 to 10 eggs of the two species, 50 eggs was the minimum amount detectable for both species. Using serial dilutions of pure DNA prepared using 80 to 1 eggs of each species/2μl DNA template in 25 μl of PCR mix, all dilutions rendered amplified products of *A. magna*, whereas the most diluted *A. perfoliata* sample to score positive was the DNA sample extracted from 10 eggs. All results were reproducible.

As a conclusion, the proposed PCR is able to distinguish between the two more frequent tapeworm infections in equids, *A. perfoliata* and *A. magna*, given that there is faecal eggs shedding, and to detect mixed infections by the three tapeworm species.

Finally, given that the present immunodiagnostic methods based on the purified fraction of 12/13 kDa of the excretion-secretion (E/S) antigen of *A. perfoliata* have not been tested against *A. magna*, the specificity of the low molecular weight fraction (12-14 kDa) of the crude E/S antigen of *A. perfoliata* is tested against *A. magna*. Additionally, new E/S and somatic *A. magna* antigens are obtained and characterized, in order to compare with the homologous of *A. perfoliata* and determine their potential usefulness in the differential diagnosis between both species.

Results revealed that the 12 - 14 kDa region of the crude E/S antigen of a *A. perfoliata* is recognized by both types of sera: positive to *A. perfoliata* and positive to *A. magna*, indicating the existence of cross-reactivity between the immunogenic components of both species at that level.

The SDS-PAGE comparison between the somatic antigen of *A. perfoliata* obtained in the present study and the homologous described by Hoglund *et al.* (1995) revealed in the antigen obtained by us a wider pattern of recognition at the low MW level, with bands also detected at 23 kDa and 10-11 kDa. The western blot analysis showed in this somatic antigen a immunoreactive region of 10 - 14

kDa against sera of horses positive to cestodes but this reactivity was nor species' specific since it was evident such for *A. perfoliata* as for *A. magna*- positive sera.

This study provides the first description of the antigenic composition of *A. magna*. The protein pattern of the E/S *A. magna* antigen mainly differed from that of *A. perfoliata* due to the absence of bands within the 23-40 kDa range in E/S *A. magna*. The somatic *A. magna* antigen differed from its *A. perfoliata* counterpart in the presence of two bands at 18 and 14 kDa. Contrary to expected after SDS-PAGE analysis, there was no apparent reaction of E/S *A. magna* antigen at the lower MWs in Western blots with any homologous or heterologous sera. As for the somatic *A. magna* antigen, reactivity was detected at 10 to 14 kDa but this was genus specific and evident for both *A. magna* and *A. perfoliata*-positive sera.

In conclusion, our findings indicate the existence of low MW immunoreactive components of unpurified E/S *A. perfoliata*, somatic *A. perfoliata* and somatic *A. magna* antigens that are recognised by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. The cross-reactivity of these components precludes their use in differential diagnosis between *A. perfoliata* and *A. magna*.

As a complementary information to the immunological diagnosis, two addenda of unpublished results are provided, one about ELISA test and other of proteomic analysis.

Addendum of ELISA test: a group of horses with known tapeworm infection status by post-mortem examination (tapeworm negative; *A. perfoliata*- positive; *A. magna*-positive; *A. perfoliata* plus *A. magna*-positive) was selected to evaluate the reliability of the E/S antigen of *A. perfoliata* in the differential diagnosis throughout two ELISA analyses: one with the purified E/S antigen of 12/13 kDa, performed in a reference laboratory, and the other performed by us with the crude E/S antigen of *A. perfoliata* according to the method described by Proudman y Trees (1996a). The results of both ELISAs showed a 100% sensibility in the detection of *A. perfoliata* but a 0% specificity in distinguishing between the two *Anoplocephala* spp. Considering the tapeworm infection as a whole, the ELISA with crude antigen showed 100% sensitivity and 80% specificity. Additionally, in a group of animals with pure *A. perfoliata* infection, a correlation coefficient (r) between tapeworm burden and optical density (O.D.) by ELISA with crude E/S antigen was calculated, with the result of a correlation coefficient of 0,57 ($P<0,05$).

Addendum of proteomic analysis: a proteomic analysis by mass spectrometry was performed with low molecular weight components (10 - 12 kDa) of the crude somatic antigens of *A. perfoliata* and *A. magna* that had shown generic immunoreactivity, in order to search for specific peptides potentially candidates for differential immunodiagnosis. The study was carried out at the *Unidad de Proteómica (Fundación Parque Científico de Madrid)* from the Universidad Complutense de Madrid. Twenty eight peptides were detected in *A. magna* and not in *A. perfoliata* antigens, from which 19 were available sequences identified in the data base of *Taenia* spp. Twenty eight peptides were detected in *A. perfoliata* and not in *A. magna*, 21 of which were available sequences identified in the data base of *Taenia* spp. Among the peptides detected in *A. magna*, there was a protein identified as *14-kDa diagnostic antigen* de *Taenia solium* which could be a candidate for the specific immunodiagnostic of *A. magna*.

9. REFERENCIAS

9. REFERENCIAS

- Agneessens, J., Claerebout, E., Vercruysse, J. 2001. Development of a copro-antigen capture ELISA for detecting *Ostertagia ostertagi* infections in cattle. Vet Parasitol 97, 229-240.
- Agneessens, J., Debever, P., Engelen, S., Vercruysse, J. 1998. The prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses in Belgium and evaluation of the diagnostic sedimentation/flotation technique. Vlaams Diergen Tijds 67.
- Back, H., Nyman, A., Lind, E.O. 2013. The association between *Anoplocephala perfoliata* and colic in Swedish horses - A case control study. Vet Parasitol 197, 580-585.
- Bain, S.A., Kelly, J.D. 1977. Prevalence and pathogenicity of *Anoplocephala perfoliata* in a horse population in South Auckland. N Z Vet J 25, 27-28.
- Barclay, W.P., Phillips, T.N., Foerner, J.J. 1982. Intussusception associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in five horses. J Am Vet Med Assoc 180, 752-753.
- Bashkirova, E.J. 1941. Contribution to the study of the biology of the tapeworm *Anoplocephala perfoliata* (Goeze, 1782), parasitic in the horse. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences De L Urss 30, 576-578.
- Beelitz, P., Gothe, R. 2001. Tapeworm infections in slaughter horses from Upper Bavaria: prevalence and worm burden as well as correlation between coprological diagnosis and infection with adult cestodes. Pferdeheilkunde 17, 423.
- Benito, A., Carmena, D., Joseph, L., Martínez, J., Guisantes, J.A. 2006. Dog echinococcosis in northern Spain: comparison of coproantigen and serum antibody assays with coprological exam. Vet Parasitol 142, 102-111.
- Beroza, G.A. 1986. Laboratory diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses. In The American Association of Equine Practicioners (Nashville, Tennessee, USA), pp. 436-439.
- Borchert, A. 1981. Parasitología Veterinaria. Acribia, Zaragoza, España.

- Boswinkel, M., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. 2007. Correlation between colic and antibody levels against *Anoplocephala perfoliata* in horses in The Netherlands. Tijdschr Diergeneesk 132, 508.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P. 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. Parasitology 110, 317-328.
- Bowman, D.D. 2003. Georgis' parasitology for veterinarians, 8th ed Edition. Saunders, Elsevier Science, St. Louis, Mo.
- Carmel, D. 1988. Tapeworm infection in horses. J Equine Vet Sci 8.
- Casaravilla, C., Malgor, R., Rossi, A., Sakai, H., Nonaka, N., Kamiya, M., Carmona, C. 2005. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection. Parasitol Int 54, 43-49.
- Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R. 2002. Gastrointestinal helminths of ponies in Louisiana: a comparison of species currently prevalent with those present 20 years ago. J Parasitol 88, 1130-1134.
- Coles, G.C. 2001. The future of veterinary parasitology, In: Vet Parasitol. Netherlands, pp. 31-39.
- Coles, G.C., Hyllier, M.H., Taylor, F.G., Villard, I. 2003. Efficacy of an ivermectin-praziquantel combination in equids against bots and tapeworms. Vet Rec 152, 178-179.
- Colwell, D., Baron, R. 1990. Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*)(Diptera, Oestridae) using ELISA. Med Vet Entomol 4, 35-42.
- Cordero del Campillo, M., Castañón Ordoñez, L., Reguera Feo, A. 1994. Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. Universidad, León.
- Cordero del Campillo, M., Rojo Vazquez, F. 1999. Parasitología Veterinaria. McGRAW-HILL, Madrid, 105-112, 540-545 pp.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the

- faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. Vet Parasitol 123, 121-131.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat Protoc 5, 503-515.
- Denegri, G., Bernadina, W., Perez-Serrano, J., Rodriguez-Caabeiro, F. 1998. Anoplocephalid cestodes of veterinary and medical significance: a review. Folia Parasit (Praha) 45, 1-8.
- Denegri, G.M. 1993. Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. 567-580.
- Drogemuller, M., Beelitz, P., Pfister, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G. 2004. Amplification of ribosomal DNA of Anoplocephalidae: *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. Vet Parasitol 124, 205-215.
- Edwards, G.B. 1986. Surgical management of intussusception in the horse. Equine Vet J 18, 313-321.
- Faleiros, R.R., de Matos, J.J.R.T., Alves, G.E.S., Santos, R.d.L., de Matos, J.J.R. 2000. *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) asociada a um caso de abdome agudo equino. Rev Bras Med Vet 22, 27-29.
- Fernandez Pato, Nélida. 2013. Anoplocefalosis equina: epidemiología de la infección en España y estudio de las lesiones producidas por "*Anoplocephala perfoliata*". Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 144p.
- Fogarty, U., del Piero, F., Purnell, R.E., Mosurski, K.R. 1994. Incidence of *Anoplocephala perfoliata* in horses examined at an Irish abattoir. Vet Rec 134, 515-518.
- French, D.D., Chapman, M.R. 1992. Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. Comp Cont Educ 14, 655-661.

- French, D.D., Chapman, M.R., Klei, T.R. 1994. Effects of treatment with ivermectin for five years on the prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in three Louisiana pony herds. Vet Rec 135, 63-65.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M., Beveridge, I. 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses-significant scope for further research, improved diagnosis and control. Parasitology 131, 1-13.
- Grubbs, S.T., Amodie, D., Rulli, D., Wulster-Radcliffe, M., Reinemeyer, C., Yazwinski, T., Tucker, C., Hutchens, D., Smith, L., Patterson, D. 2003. Field evaluation of moxidectin/praziquantel oral gel in horses. Vet Therap 4, 249-256.
- Höglund, J., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Uggla, A. 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. Vet Parasitol 59, 97-106.
- Höglund, J., Nilsson, O., Ljungström, B.L., Hellander, J., Lind, E.O., Uggla, A. 1998. Epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in foals on a stud farm in south-western Sweden. Vet Parasitol 75, 71-79.
- Hung, G.C., Gasser, R., Beveridge, I., Chilton, N. 1999. Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles. Parasitology 119, 69-80.
- Kania, S.A., Reinemeyer, C.R. 2005. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. Vet Parasitol 127, 115-119.
- Kingsbury, P.A., Reid, J.F. 1981. Anthelmintic activity of paste and drench formulations of oxfendazole in horses. Vet Rec 109, 404-407.
- Kjaer, L.N., Lungholt, M.M., Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Maddox-Hyttel, C. 2007. Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. Eq Vet J 39, 529-533.
- Lichtenfels, J.R. 1975. Helminths of domestic equids. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 42, 92.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., Swerczek, T.W. 1986. Pyrantel pamoate: evaluating its activity against equine tapeworms. Vet Med-Us 81, 280-285.

- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Granstrom, D.E., Stamper, S. 1992. Activity of praziquantel against *Anoplocephala perfoliata* (cestoda) in horses. J Helminth Soc Washington 59, 1-4.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ennis, L.E. 1998. Efficacy of praziquantel (0.25 mg kg⁻¹) on the cecal tapeworm (*Anoplocephala perfoliata*) in horses. Vet Parasitol 78, 287-289.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Stamper, S. Drudge, J.H., Granstrom, D.E., Collins, S.S. 1995. Activity of parziquantel (0.5 mg kg⁻¹) against *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda) in equids. Vet Parasitol 56, 255-257.
- Little, D., Blikslager, A.T. 2002. Factors associated with development of ileal impaction in horses with surgical colic: 78 cases (1986 - 2000. Equine Vet J 34, 464-468.
- Maddox-Hyttel, C., Sørensen, T., Proudman, C., Farlam, J., Andersen, B. 2005. *Anoplocephala perfoliata* infection in Denmark. Dansk Veterinærtidsskrift 88, 20-22.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (UK). 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Freeman and Company, New York.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y medio Ambiente). 2014. El sector equino en cifras. Principales indicadores económicos en 2013. Accesible en URL: <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/equino/default.aspx>. Fecha de acceso: Junio 2015.
- Martins, I.V.F., Verocai, G.G., Correia, T., Mello, R., Freitas, I., Pereira, M.J.S., Scott, F.B. 2003. Validação de uma modificação da técnica de centrifugo-flutuação (Beroza *et al.* 1986) para o diagnóstico de cestóides em eqüídeos. Brazil J Vet Parasitol 12, 99-102.
- Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., Dowdall, S.M.J., Proudman, C.J. 2004. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. Vet Res 35, 371-381.

- Meana, A., Luzón, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M. 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. Vet Parasitol 74, 79-83.
- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J. 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. Research and reviews in parasitology-Revista ibérica de parasitología 3-4, 93-95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M. 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. Vet Parasitol 130, 233-240.
- Mercier, P. Alves-Branco, F., Sapper, M. D. F., White, C.R. 2003. Evaluation of the safety of ivermectin-praziquantel administered orally to pregnant mares. Am J Vet Res 64, 1121-1124.
- Mezerova, J., Koudela, B., Vojtkova, M. 2007. Equine colic caused by tape worms-5 clinical case reports. Prakt Tierarzt 88, 26.
- Monahan, C.M., Chapman, M.R., Taylor, H.W., French, D.D., Kley, T.R. 1996. Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae. Vet Parasitol 63, 225-235.
- Möning, B.A. 1925. Three new helmins. Transactions of the Royal Society of South Africa 13, 291-298.
- Narsapur, V.S. 1988. Pathogenesis and biology of anoplocephaline cestodes of domestic animals. Ann Rech Vet 19, 1-17.
- Nielsen, M.K. 2015. Equine tapeworm infections: Disease, diagnosis and control. Equine Vet Edu doi: 10.1111/eve.12394.
- Nilsson, O., Ljungström, B.L., Höglund, J., Lundquist, H., Uggla, A. 1995. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. Acta Vet Scand 36, 319-328.
- Noordhuizen, J. P. T. M., Frankena, K., van der Hood, C.M., Graat, E.A.M. 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands. Pp. 445.

- Okamoto, M., Agatsuma, T., Kurosawa, T., Ito, A. 1997. Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology* 115, 661–666.
- Oliver, D.F., Jenkins, C.T., Walding, J.P. 1977. Duodenum rupture in a nine-month-old colt due to *Anoplocephala magna*. *Vet Rec* 101, 80.
- Owen, R.A., Jagger, D.W., Quan-Taylor, R. 1989. Caecal intussusceptions in horses and the significance of *Anoplocephala perfoliata*. *Vet Rec* 124, 34-37.
- Panadero-Fontán, R., Lopez-Sández, C., Parra-Fernández, F., Morrondo-Pelayo, P., Di'ez-Banos, P., Colwell, D.D. 2002. Detection of circulating hypodermin C: an antigen capture ELISA for diagnosis of cattle grub (Diptera: Oestridae) infestations. *Vet Parasitol* 108, 85-94.
- Pearson, G.R., Davies, L.W., White, A.L., O'Brien, J.K. 1993. Pathological lesions associated with *Anoplocephala perfoliata* at the ileo-caecal junction of horses. *Vet Rec* 132, 179-182.
- Pittaway, C.E., Lawson, A.L., Coles, C.G., Wilson, A.D. 2014. Systemic and mucosal IgE antibody responses of horses to infection with *Anoplocephala perfoliata*. *Vet Parasitol* 199, 32-41.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B. 1992. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet Rec* 131, 71-72.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B. 1993. Are tapeworms associated with equine colic? A case control study. *Equine Vet J* 25, 224-226.
- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J. 1998. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet J* 30, 194-199.
- Proudman, C.J., Holdstock, N.B. 2000. Investigation of an outbreak of tapeworm-associated colic in a training yard. *Equine Vet J* 32, 37-41.
- Proudman, C.J., Trees, A.J. 1996a. Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. *Vet Parasitol* 61, 239-247.

- Proudman, C.J., Trees, A.J. 1996b. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. Parasite Immunol 18, 499-506.
- Proudman, C.J., Trees, A.J. 1999. Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses. Parasitol Today 15, 156-159.
- Reeves, M.J., Salman, M.D., Smith, G. 1996. Risk factors for equine acute abdominal disease (colic): results from a multicenter case-control study. Prev Vet Med 26, 285-301.
- Rehbein, S., Holste, J.E., Doucet, M.Y., Fenger, C. Paul, A.J., Reinemeyer, C.R., Smith, L.L., Yoon, S., Marley, S.E. 2003. Field efficacy of ivermectin plus praziquantel oral paste against naturally acquired gastrointestinal nematodes and cestodes of horses in North America and Europe. Vet Therap 4, 220-227.
- Rehbein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R. 2011. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. J Helminthol 85, 409-414.
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R. 2013. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. Parasitol Res 112, 407-413.
- Rehbein, S., Visser, M., Yoon, S., Marley, S.E. 2007. Efficacy of a combination ivermectin/praziquantel paste against nematodes, cestodes and bots, in naturally infected ponies. Vet Rec 161, 722-724.
- Reinemeyer, C.R., Hutchens, D.E., Eckblad, W.P., Marchiondo, A.A., Shugart, J.I. 2006. Dose-confirmation studies of the cestocidal activity of pyrantel pamoate paste in horses. Vet Parasitol 138, 234-239.
- Rodríguez-Bertos, A., Corchero, J., Castaño, M., Peña, L., Luzón, M., Gómez-Bautista, M., Meana, A. 1999. Pathological alterations caused by *Anoplocephala perfoliata* infection in the ileocaecal junction of equids. J Vet Med A 46, 261-269.

- Ryu, S.H., Bak, U.B., Kim, J.G., Yoon, H.J., Seo, H.S., Kim, J.T., Park, J.Y., Lee, C.W. 2001. Cecal rupture by *Anoplocephala perfoliata* infection in a thoroughbred horse in Seoul Race Park, South Korea. J Vet Sci 2, 189-193.
- Sengbusch, H.G. 1977. Review of oribatid mite anoplocephalan tapeworm relationships (Acari; Oribatei: Cestoda; Anoplocephalidae). Biology of Oribatid Mites., p. 87-102.
- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P. 2010. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. Vet Parasitol 172, 249-255.
- Slocombe, J.O. 1979. Prevalence and treatment of tapeworms in horses. Can Vet J 20, 136-140.
- Slocombe, J.O. 2004. A modified critical test for the efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. Can J Vet Res 68, 112-117.
- Slocombe, J.O. 2006. A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess the efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. Vet Parasitol 136, 127-135.
- Slocombe, J.O., Heine, J., Barutzki, D., Slacek, B. 2007. Clinical trials of efficacy of praziquantel horse paste 9% against tapeworms and its safety in horses. Vet Parasitol 144, 366-370.
- Schmidt, G.D. 1986. Handbook of tapeworm identification. CRC Press Florida Pp. 433-443.
- Sotiraki, S., Badouvas, A., Himonas, C. 1997. A survey on the prevalence of internal parasites of equines in Macedonia and Thessalia-Greece. J Equine Vet Sci 17, 550-552.
- Soulsby, E.J.L. 1987. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias México*, D.F.
- Stunkard, H.W. 1938. The development of *Moniezia expansa* in the intermediate host. Parasitology 30, 491-501.
- Tarazona Vilas, J. M. 1999. Parasitosis de los équidos. Cestodosis intestinales: anoplocephalidosis. En: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid: 540-545.

- Tennant, B.e.a. 1972. Observations on the causes and incidence of acute intestinal obstruction in the horse. Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 18, 251-257.
- Thompson, R.C. 1999. Veterinary parasitology: looking to the next millennium, In: Parasitol Today. England, pp. 320-325.
- Tinker, M.K., White, N.A., Lessard, P., Thatcher, C.D., Pelzer, K.D., Davis, B., Carmel, D.K. 1997a. Prospective study of equine colic incidence and mortality. Equine Vet J 29, 448-453.
- Tinker, M.K., White, N.A., Lessard, P., Thatcher, C.D., Pelzer, K.D., Davis, B., Carmel, D.K. 1997b. Prospective study of equine colic risk factors. Equine Vet J 29, 454-458.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Szczepaniak, K.O., Grzybek, M., Studzińska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczeń-Karczmarz, M. 2014. Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. Parasitol Res DOI 10.1007/s00436-014-3919-4.
- Traub-Dargatz, J.L., Koprak, C.A., Seitzinger, A.H., Garber, L.P., Forde, K., White, N.A. 2000. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. J Am Vet Med Assoc 219, 67-71.
- Traversa, D., Fichi, G., Campigli, M., Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C.J., Pellegrini, D., Perrucci, S. 2008. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidae). Vet Parasitol 152, 271-277.
- Trotz-Williams, L., Physick-Sheard, P., McFarlane, H., Pearl, D.L., Martin, S.W., Peregrine, A.S. 2008. Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. Vet Parasitol 153, 73-84.
- Tsiafouli, M.A., Kallimanis, A.S., Katana, E., Stamou, G.P., Sgardelis, S.P. 2005. Responses of soil microarthropods to experimental short-term manipulations of soil moisture. Appl Soil Ecol 29, 17-26.

- Van Herwerden, L., Gasser, R.B., Blair, D. 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. Int J Parasitol 30, 157-169.
- Verneau, O., Renaud, F., Catzefflis, F. 1997. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. Mol Biol Evol 14, 630-636.
- Ward, M., Lyndal-Murphy, M., Baldock, F. 1997. Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces. Vet Parasitol 73, 181-187.
- Williamson, R.M., Beveridge, I., Gasser, R.B. 1998. Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. Aust Vet J 76, 618-621.
- Williamson, R.M., Gasser, R.B., Middleton, D., Beveridge, I. 1997. The distribution of *Anoplocephala perfoliata* in the intestine of the horse and associated pathological changes. Vet Parasitol 73, 225-241.
- Yong, W., Heath, D., Van Knapen, F. 1984. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* infections in sheep. Res Vet Sci 36, 24.
- Zehnder, M.P., de Chambrier, A. 2000. Morphological and molecular analyses of the genera *Peltidocotyle* Diesing 1850 and *Othinosclex* Woodland 1933, and a morphological study of *Woodlandiella* Freze, 1965 (Eucestoda, Proteocephalidea), parasites of South American siluriform fishes (Pimelodidae). Syst Parasitol 46, 33-43.

10. ANEXO DE PUBLICACIONES

10. ANEXO DE PUBLICACIONES

1. **“Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*”** (Bohórquez *et al.*, 2014. *Vet Parasitol* 204, 396-401).
2. **“New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tape worm”** (Bohórquez *et al.*, 2015; *Vet Parasitol* 207, 56 – 63).
3. **“Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *A. magna* antigens”** (Bohórquez *et al.*, 2012; *Vet Parasitol* 190, 87 – 94).



Short Communication

Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*

Alejandro Bohórquez^a, Aránzazu Meana^a, Nélida F. Pato^b, Mónica Luzón^{a,*}^a Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida de Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain^b Hospital Clínico Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad Alfonso X El Sabio, Avenida Universidad 1, Villanueva de la Cañada, 28691 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2013

Received in revised form 16 April 2014

Accepted 21 April 2014

Keywords:

Sensitivity

Specificity

Copro-diagnosis

*Anoplocephala perfoliata**Anoplocephala magna*

Host-age distribution

ABSTRACT

Current copro-diagnostic tests for *Anoplocephala perfoliata* show high variation in their sensitivity and given the morphological similarity of *Anoplocephala* spp. eggs, this could be related to the presence of *Anoplocephala magna* alone or co-existing with *A. perfoliata*. In the present study, coprology was significantly more sensitive ($p < 0.01$) at detecting *A. magna* than *A. perfoliata*. This difference was independent of the parasite burden and was greater when testing was limited to horses with mature or gravid tapeworms. *A. magna* infection was strongly linked to young horses (≤ 2 years). The eggs of *A. magna* are smaller. Using 15 and 70 μm cut-offs for oncosphere diameter and the major shell bisector length, respectively, the eggs of *A. perfoliata* were identified with 100% sensitivity, 97% specificity and 98% sensitivity, 84% specificity. The use of these two morphometric variables would therefore be useful for the copro-identification of *A. perfoliata* in countries where both species coexist.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anoplocephala perfoliata (Cyclophyllidae, Anoplocephalidae) is a common intestinal tapeworm that affects horses worldwide. Mounting evidence suggests that *A. perfoliata* is responsible for several intestinal disorders (review by Gasser et al., 2005), and its accurate detection is crucial for both clinical and epidemiological purposes. Currently available diagnostic methods are based on the assumption that *A. perfoliata* is the only epidemiologically significant tapeworm to parasitize domestic horses. However, this assumption does not hold true in countries such as USA or Spain. In USA, *Anoplocephala magna*, a cestode of limited pathogenicity, is at least as prevalent

as *A. perfoliata*, (Lichtenfels, 1975). In Spain, since the first detection of *A. magna* in abattoirs in northern and central regions (Meana et al., 2002), this cestode has been frequently detected throughout the country, although with different seasonality from *A. perfoliata* (Meana et al., 2005).

To improve the diagnosis of *A. perfoliata* infection, several methods have been developed including the detection of parasite eggs in faeces using improved centrifugation and flotation techniques, though these methods have shown considerable variation in their sensitivity: from 40 to 62% (Gasser et al., 2005) to 75% (Rebhein et al., 2011). Besides differences inherent to each technique, some factors that could contribute to this variability are the intensity of infection, the irregular shedding of proglottids or the maturity state of the tapeworms, but the possibility of infection/coinfection with *A. magna*, should also be considered.

* Corresponding author. Tel.: +34 3943948; fax: +34 91 3943908.
E-mail address: mluzon@vet.ucm.es (M. Luzón).

Thus, in areas where both these two *Anoplocephala* species coexist, the copro-diagnosis of equine cestodoses has been hindered because of the morphological similarity between the eggs of the two species. The information on shell diameter is scarce and applicable to *A. perfoliata* 65–80 μm , see reviews by (Soulsby, 1987; Tarazona Vilas, 1999; Gasser et al., 2005) but not to *A. magna*. According to different reviews, the eggs of *A. magna* are either smaller 50–60 μm in (Soulsby, 1987) or larger 70–80 μm in (Tarazona Vilas, 1999) than those of *A. perfoliata*. The limited data on the oncosphere indicates a larger diameter for *A. perfoliata* (16 μm) than *A. magna* (8 μm) (Tarazona Vilas, 1999).

The differences in pathogeny and ecology between both tapeworm species justify the necessity of differential diagnostic methods. In order to evaluate the reliability and accuracy of the copro-diagnosis in the detection of *A. perfoliata* in the presence of *A. magna*, the sensitivity of the copro-diagnosis of *A. perfoliata* and *A. magna* was examined in horses identified by necropsy as positive for *Anoplocephala* spp. as single or double infections. The distribution of each species according to the age and sex of the host was also examined. Finally, the reliability of two morphometric variables (major shell bisector length and oncosphere diameter) for the identification of eggs of both *Anoplocephala* species was assessed.

2. Materials and methods

2.1. Sensitivity of coprology as a diagnostic test

The digestive tracts of horses slaughtered in Spain were dissected and 130, classified as positive for *Anoplocephala* spp. infection by visual inspection, used as the reference standard. All cestodes recovered from each digestive tract were fixed in 70% ethanol for their identification and recording of tapeworm burdens. Faeces were taken directly from the rectum of each infected animal and 40 g analyzed by the sedimentation/flotation method described by Meana et al. (1998) to detect *Anoplocephala* spp. eggs. The sensitivity of coprology as a diagnostic test was then calculated for each *Anoplocephala* species.

The stage of infection of each horse was also established according to morphological criteria. For *A. perfoliata*, tapeworms were classified as “immature” (lancet-shaped) versus “mature” (triangular-shaped) according to Schuster (1991). For *A. magna*, small (<9 cm long) uniformly shaped tapeworms were defined as “immature” as compared to longer “mature” tapeworms with wider, mostly darker, terminal segments. The sensitivity of coprology as a diagnostic test was also calculated for each species using the horses with mature tapeworms as the reference standard.

The presence of eggs in terminal proglottids of tapeworms classified as “mature” was investigated in a group of horses with a low parasite burden (<30 tapeworms). The sensitivity of coprology was also calculated for each species using the horses with gravid tapeworms as the reference standard. Statistical analyses of sensitivities were performed by the Chi squared test.



Fig. 1. Egg of *Anoplocephala* spp., showing the oncosphere diameter (a) and the major shell bisector (b).

2.2. Host distribution of species

Of the 130 animals selected as positive for *Anoplocephala* spp., only 94 animals could be identified by sex (45 males and 49 females) and age (66 young, i.e. ≤ 2 -years-old, and 28 adults, i.e. > 2 -years-old) as the slaughterhouses records were not always accessible. Of these, animals with a single infection ($n = 43$ *A. perfoliata* and $n = 29$ *A. magna*) were selected to establish the distribution of species according to host age or sex.

2.3. Egg morphology

Anoplocephala eggs were collected from about 10 specimens of each *Anoplocephala* spp., in both cases coming from more than two animals, in order to increase the quality of the samples representation. The last gravid segment of each tapeworm was sectioned across the rear transverse line with a scalpel, and the eggs collected by shaking the sectioned segments inside Eppendorf® tubes (volume 1.5 ml) filled with tap water. For each species, the contents collected from different tapeworms were mixed together.

Under a light microscope (Nikon), 100 eggs of each species were examined at a magnification of $\times 400$ to obtain two measurements: (a) the diameter of the oncosphere, and (b) the length of the major shell bisector (Fig. 1). The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of each morphometric character to identify each *Anoplocephala* species were calculated by selecting an optimal cut-off for each measurement based on the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve (Noordhuizen et al., 1997). Briefly, the ROC curve displays the relationship between the true positive fraction (Se) and the false positive fraction ($1 - \text{Sp}$) over the range of possible cut-off values. In the ROC analysis, the optimal cut-off value is that with “sensitivity plus specificity” (Se + Sp) at a maximum. The area under the ROC curve (AUC) is a measurement of the validity of the analysis, with a value of 1 representing the perfect analysis. These calculations

were carried out using the “Threshold value of a diagnostic test” option of Win Episcope 2.0.

3. Results

3.1. Sensitivity of coprology as a diagnostic test

Tapeworm burdens, infecting parasites and coprological results are provided in Table 1. Sixty four animals harboured *A. perfoliata* and 35 animals harboured *A. magna* as a single infection, while 35 animals harboured both *Anoplocephala* spp. infections. Tapeworm burdens were mostly low (1–30 tapeworms) for both species (68% *A. perfoliata* and 89% *A. magna*). High *A. perfoliata* burdens (>100 tapeworms) were in the ranges 115–396 in single infections and 138–1113 in double infections, whereas *A. magna* burdens were 130–170 in double infections. The diagnostic sensitivities of coprology were 11 and 51% respectively for *A. perfoliata* and *A. magna* in single infections and 58% in double infections. Considering single and double infections together, sensitivities were 26% for *A. perfoliata* and 55% for *A. magna*. Statistical analysis indicated a significantly higher ($p < 0.01$) sensitivity to detect *A. magna* than *A. perfoliata* when comparing both single and single plus double infections. For both species, low tapeworm burdens predominated over moderate (31–100 tapeworms) or high burdens in animals returning a positive coprology test.

As shown in Table 2, in the subset of horses with mature tapeworms, sensitivity was significantly lower ($p < 0.01$) in animals parasitized with *A. perfoliata* (15%) than with *A. magna* (75%). Similar results were obtained in animals harbouring gravid tapeworms (20% vs 79%, $p < 0.01$).

3.2. Host distribution of species

The presence of *A. magna* as a single infection ($n = 29$) was significantly associated ($p < 0.01$) with host age (90% young, $n = 26$ vs 10% adults, $n = 3$). These results differed significantly ($p < 0.01$) from those recorded for single *A. perfoliata* infections ($n = 43$) (53% foals, $n = 23$ vs 47% adults, $n = 20$) in which no age association was observed. Only three adult females harboured *A. magna* as a single infection; of them, one was a pregnant mare at the time of necropsy and other mare had foaled six months earlier. No host sex predilection was observed of either species (*A. perfoliata*: 40% males, $n = 17$ vs 60% females, $n = 26$; *A. magna*: 52% males, $n = 15$ vs 48% females, $n = 14$).

Of the subset of animals showing *A. magna* as a double infection (22 animals that were excluded from the host distribution analysis), five were adults (3 females and 2 males).

3.3. Identification according to egg morphology

3.3.1. Oncosphere diameter (Fig. 1a)

As shown in Table 3 the oncosphere diameter of the *A. perfoliata* eggs examined ranged from 15 to 25 μm (mean \pm SD 17.78 ± 1.28), with a mode of 17.5 μm (84% of *A. perfoliata* eggs). For *A. magna* eggs, oncosphere diameters were 10–17.5 μm (mean \pm SD 12.21 ± 1.34), with a mode of 12.5 μm (44% of *A. magna* eggs). In 100% of *A. perfoliata* eggs,

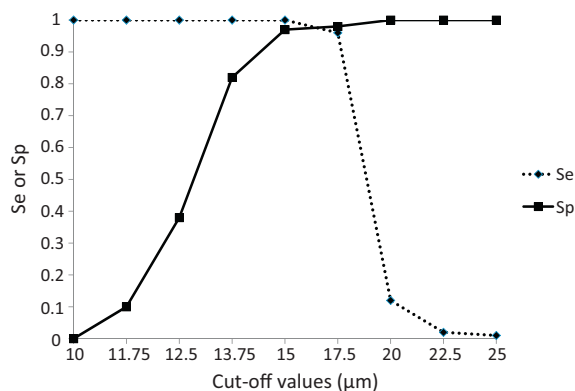


Fig. 2. Sensitivity (Se) and specificity (Sp) for each potential cut-off value oncosphere diameter to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs, obtained from the observation of 100 eggs of each species.

oncospheres were $\geq 15 \mu\text{m}$ whereas in 97% of *A. magna* eggs they were $< 15 \mu\text{m}$. According to the ROC analysis, the optimal threshold to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs was a diameter of 15 μm . Using this cut-off, eggs of *A. perfoliata* would be distinguished from *A. magna* with a sensitivity of 100% and specificity of 97% (Fig. 2). The AUC was 0.99 (95% C.I.: 0.98–0.99), indicating high accuracy.

3.3.2. Major shell bisector length (Fig. 1b)

As shown in Table 3, the *A. perfoliata* egg shell's major bisector was 65–112.5 μm long (mean \pm SD 80.63 ± 8.14) with values in the range 77.5–85 μm showing highest frequencies (58% of the eggs). Lengths for *A. magna* ranged from 57.5 to 75 μm (mean \pm SD 65.06 ± 3.94), and the highest frequency range was 62.5–67.5 μm (52% of the eggs). In 98% of *A. perfoliata* eggs, shell bisectors were $\geq 70 \mu\text{m}$, whereas in 84% of *A. magna* eggs they were $< 70 \mu\text{m}$. According to the ROC analysis, 70 μm was selected as the optimal cut-off bisector length to distinguish between the eggs of *A. perfoliata* and *A. magna* with a sensitivity of 98% and specificity of 84% (Fig. 3). The AUC was 0.97 (95% C.I.: 0.96–0.98), indicating high accuracy.

4. Discussion

This study reveals that as a diagnostic test, coprology is significantly more sensitive to detect *A. magna* than *A. perfoliata*. This difference was independent of the tapeworm burden since low burdens of both *Anoplocephala* spp. were predominant in animals testing positive by coprology. The higher sensitivity of the test observed here for *A. magna* over *A. perfoliata* was even more evident in horses parasitized with mature or gravid tapeworms. Using this sample, any possible biases due to an immature tapeworm stage were ruled out. The most likely explanation for it is the larger size of *A. magna*, whose long strobila is made up of wide segments that break-off in groups when gravid. In contrast, *A. perfoliata* is much smaller and its gravid proglottids form and break away at a much slower rate. Another finding of this study was the preference shown by *A. magna* for young (≤ 2 years) horses. Thus, 90% of single infections

Table 1Tapeworm burdens and coprological results of 130 horses parasitized by *A. perfoliata* and *A. magna* as a single or double infection.

Infection	Tapeworm burden			Total animals N = 130	Coprological results	
	1–30	31–100	>100		Faeces +	Sensitivity
<i>A. perfoliata</i>	65 (17) ^a	17 (6) ^a	13 (2) ^a	95	25	26% (18–36) ^b
Single	46 (5) ^a	10 (1) ^a	8 (1) ^a	64	7	11% (5–21) ^b
Double	19 (12) ^a	7 (5) ^a	5 (1) ^a	31	18	58% (40–75) ^b
<i>A. magna</i>	59 (29) ^a	4 (4) ^a	3 (3) ^a	66	36	55% (42–66) ^b
Single	32 (15) ^a	3 (3) ^a	0	35	18	51% (34–69) ^b
Double	27 (14) ^a	1 (1) ^a	3 (3) ^a	31	18	58% (40–75) ^b

^a Animals testing positive by coprology.^b 95% Confidence interval.**Table 2**Coprological results of 81 horses with mature tapeworms of *A. perfoliata* (n = 53) or *A. magna* (n = 28), as a single or double infection, and of 24 horses with gravid tapeworms of *A. perfoliata* (n = 10) or *A. magna* (n = 14), as a single or double infection.

Infection	Number of animals	Coprological results	
		Faeces +	Sensitivity (95% C.I.)
Mature <i>A. perfoliata</i>	53	8	15% (7–27)
Single	48	7	
Double ^a	5	1	
Mature <i>A. magna</i>	28	21	75% (55–89)
Single	25	18	
Double ^a	3	3	
Gravid <i>A. perfoliata</i>	10	2	20% (3–52)
Single	10	2	
Double ^a	0	–	
Gravid <i>A. magna</i>	14	11	79% (52–94)
Single	5	4	
Double ^a	9	7	

^a Animals with double *Anoplocephala* spp. infection but having only mature or gravid tapeworms of the mentioned species.

by *A. magna* were detected in young animals. Only three adult females were parasitized by *A. magna* as a single infection, one of them being pregnant and other a postparturient mare. Tapeworm infections have been related to host age in other Anoplocephalidae infections such as those of cattle with *Moniezia* spp. (Ramajo Martín and Muro, 1999). Although more work is needed, the finding of *A. magna*

infection in young animals and pregnant/postparturient mares could be related to factors associated to young age or pregnancy.

The higher coprological sensitivity detected towards *A. magna* and the strong preference shown by this species for young animals mean that past epidemiological studies have probably overestimated the prevalence of *A. perfoliata*

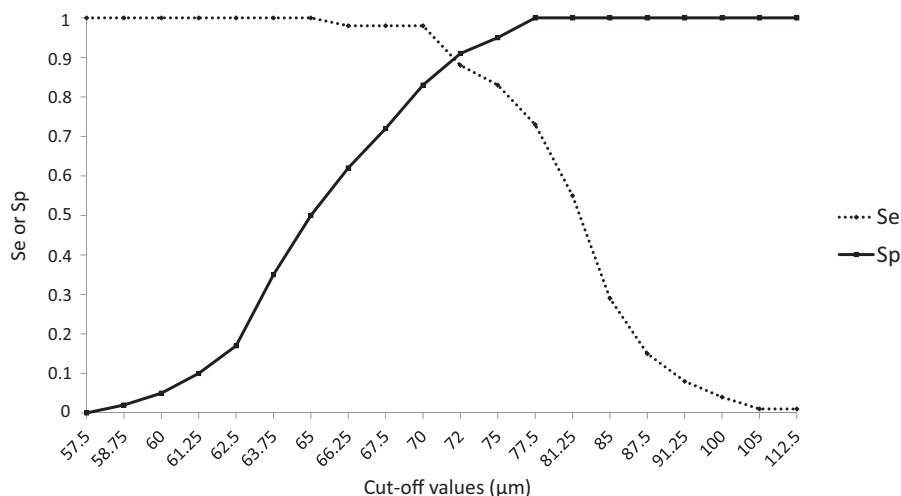


Fig. 3. Sensitivity (Se) and specificity (Sp) for each potential cut-off value major shell bisector to distinguish between *A. perfoliata* and *A. magna* eggs, obtained from the observation of 100 eggs of each species.

Table 3

Results of measuring the oncosphere diameter (left) and the major shell bisector (right) in 100 eggs of *A. magna* and 100 eggs of *A. perfoliata*. The black line represents the optimal cut-off between *A. perfoliata* and *A. magna* values. Grey area below the black line represents false positive values. White area above the black line represents false negative values.

Oncosphere diameter (μm)	Number of eggs		Major shell bisector (μm)	Number of eggs	
	<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>		<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>
10	0	10	57.5	0	2
11.25	0	28	58.75	0	3
12.5	0	44	60	0	5
13.75	0	15	61.25	0	7
15	4	1	62.5	0	18
17.5	84	2	63.75	0	15
20	10	0	65	2	12
22.5	1	0	66.25	0	10
25	1	0	67.5	0	11
			70	10	8
			72	5	4
			75	10	5
			77.5	18	0
			80	7	0
			82.5	19	0
			85	14	0
			87.5	7	0
			90	2	0
			92.5	2	0
			100	1	0
			105	1	0
			112.5	2	0

in areas where both occur, especially those performed in young horses, given the morphological similarity of *Anoplocephala* spp. eggs.

Despite the morphological similarity of the eggs, the morphometric analysis revealed differences in the oncosphere diameter and major shell bisector length. In both cases, measurements were larger for *A. perfoliata* than *A. magna*. The difference in the major shell bisector is in line with the description by Soulsby (1987), yet is inconsistent with the findings of Tarazona Vilas (1999) who reported the similar or greater size of *A. magna* eggs. As for the oncosphere diameter, the figures are consistent with data provided by Tarazona Vilas (1999), although this author's oncosphere measurements for *A. magna* were smaller.

According to those morphometric data, both cut-offs, oncosphere diameter and major shell bisector length, were assigned to distinguish the eggs of *A. perfoliata* from those of *A. magna* with high accuracy, especially with the oncosphere diameter cut-off. The diagnostic implication of this finding is remarkable as no clear morphometric

differentiation had been reported so far. Control programmes with an epidemiological basis must rely on specific diagnoses. In this respect, current immunodiagnostic methods may not discriminate between both *Anoplocephala* spp. (Bohórquez et al., 2012) and possibly the identification will rely on molecular tools. For the moment, the use of these two morphometric traits could help the coprological identification of *A. perfoliata*. Despite its many limitations, in most laboratories coprology is still a routine technique of diagnosing a parasite disease. Notwithstanding the demonstrated sensitivity problems of the copro-diagnosis of *A. perfoliata*, we propose that this method would be especially useful in young animals reared in countries like the USA or Spain where the coexistence of both species has been demonstrated (Lichtenfels, 1975; Meana et al., 2002, 2005).

Conflict of interest statement

The authors declare that no competing interests exist.

Acknowledgements

This work was supported by Contract No 5281526 Virbac España, S.A. / U.C.M. The authors thank M. Martínez-Izquierdo for help with the microscopy measurements.

References

- Bohórquez, A., Meana, A., Luzón, M., 2012. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens. *Vet. Parasitol.* 190, 87–94.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M.C., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses – significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131, 1–13.
- Lichtenfels, J.R., 1975. Helminths of domestic equids. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 42 (special issue), 92 pp.
- Meana, A., Luzón, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M., 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* 74, 79–83.
- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J., 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. *Rev. Ibér. Parasitol.* 3–4, 93–95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M., 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. *Vet. Parasitol.* 30, 233–240.
- Noordhuizen, J.P.T.M., Frankena, K., van der Hood, C.M., Graat, E.A.M., 1997. *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Wageningen Press, Wageningen, The Netherlands, pp. 445.
- Ramajo Martín, V., Muro Álvarez, A., 1999. Parasitosis de los rumiantes. Cestodosis digestivas: anoplocephalidosis. In: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 229–234.
- Rebhein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2011. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J. Helminthol.* 85, 409–414.
- Schuster, R., 1991. Morphometric analysis of an *Anoplocephala perfoliata* population. *Angew. Parasitol.* 32, 105–111 (in German).
- Soulsby, E.J.L., 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Interamericana, Mexico, pp. 823 (1st ed. in Spanish, Translation of the 7th ed. in English).
- Tarazona Vilas, J.M., 1999. Parasitosis de los équidos. Cestodosis intestinales: anoplocephalidosis. In: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 540–545.



New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm



G. Alejandro Bohórquez^a, Mónica Luzón^a, Raquel Martín-Hernández^b, Aránzazu Meana^{a,*}

^a Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Regional Agricultural Center & Parque Científico de Albacete (INCRECYT, FEDER) Junta de Comunidades de Castilla La Mancha, 19180 Marchamalo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2013

Received in revised form 30 October 2014

Accepted 5 November 2014

Keywords:

Anoplocephala magna

Anoplocephala perfoliata

Anoplocephaloides mamillana

Multiplex-PCR

Diagnostic

ABSTRACT

Although several techniques exist for the detection of equine tapeworms in serum and feces, the differential diagnosis of tapeworm infection is usually based on postmortem findings and the morphological identification of eggs in feces. In this study, a multiplex polymerase chain reaction (PCR)-based method for the simultaneous detection of *Anoplocephala magna*, *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephaloides mamillana* has been developed and validated. The method simultaneously amplifies hypervariable SSUrRNA gene regions in the three tapeworm species in a single reaction using three pairs of primers, which exclusively amplify the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) in each target gene. The method was tested on three types of sample: (a) 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 and 1/5000 dilutions of 70 ng of genomic DNA of the three tapeworm species, (b) DNA extracted from negative aliquots of sediments of negative control fecal samples spiked with 500, 200, 100, 50 and 10 eggs (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A. mamillana* eggs available) and (c) DNA extracted from 80, 50, 40, 30, 10 and 1 egg per 2 µl of PCR reaction mix (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A. mamillana* eggs available). No amplification was observed against the DNA of *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris*. The multiplex PCR method emerged as specific for the three tapeworms and was able to identify as few as 50 eggs per fecal sample and as little as 0.7 ng of control genomic DNA obtained from the three species. The method proposed is able to differentiate infections caused by the two most frequent species *A. magna* or *A. perfoliata* when the eggs are present in feces and is also able to detect mixed infections by the three cestode species.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tapeworm infections in horses are caused by several species found in the gut that belong to the family Anoplocephalidae (Order Cyclophyllidea). The most commonly occurring tapeworms are those of the genus *Anoplocephala*: *Anoplocephala perfoliata* Goeze, 1782 and

Anoplocephala magna Abildgaard, 1789. A third cestode to affect horses is the dwarf tapeworm *Anoplocephaloides* (syn. *Paranoplocephala*) *mamillana* Mehlis, 1813. All these parasites have an indirect life cycle in which forage mites play a role as intermediate hosts. Their life cycle commences with the ingestion of mites present in soil and green grass by grazing animals.

Over the past 20 years, horse tapeworms have attracted the attention of researchers, especially since *A. perfoliata*, a worldwide parasite that lives in and around the ileocecal valve, was directly associated with certain types of

* Corresponding author. Tel.: +34 3943903; fax: +34 91 3943908.
E-mail address: ameana@ucm.es (A. Meana).

colic including ileal intussusception and spasmodic colic (Proudman et al., 1998). In subsequent investigations, the presence of tapeworms was detected in serious unhealthy conditions such as intestinal rupture (Ryu et al., 2001), impaction or invagination (Barclay et al., 1982; Beroza et al., 1983; Biglietti and Garbanati, 2000).

Prevalences reported for *A. perfoliata* can vary from low (Slocombe, 1979; Lyons et al., 1983; Gawor, 1995) to high which may depend directly on the diagnostic method used by researchers, with higher prevalences when *postmortem* than *in vivo* (for example 53% by necropsy versus 7% by coprology in Lyons et al., 1983), but also depending on the sampling region and climate (for example 18–82%, Gasser et al., 2005; 15.9–36.5%, Rehbein et al., 2013). Most references to *A. magna* have mentioned a low prevalence, rarely over 4%, while in certain areas like in Spain is around 20%, at least as prevalent as *A. perfoliata* (Meana et al., 2002, 2005). Scarce data exist on its repercussions on health; only two cases of massive infection concomitant with fatal cases of colic have been cited related to *A. magna* presence (Oliver et al., 1977; Faleiros et al., 2000).

The differential diagnosis of tapeworm infection relies on postmortem findings and the morphological identification of eggs in feces. Cestode eggs are easily distinguishable from the eggs of other parasites that may also appear in feces; they are large, peculiarly shaped and contain an oncosphere within a pyriform apparatus. However, species identification of a tapeworm's egg is a difficult task (distinction requires accurate measuring of oncosphere diameter and major shell bisector; Bohórquez et al., 2014).

Several techniques have been developed to improve the sensibility of detection of tapeworm eggs in feces (Beroza, 1986; Proudman and Edwards, 1992; Nilsson et al., 1995; Meana et al., 1998; Proudman and Trees, 1999; Rehbein et al., 2011). Most of these methods, based on flotation centrifugation, have shown a low to moderate sensitivity, ranging from 37 to 72.8% (Proudman and Edwards, 1992; Ihler et al., 1995; Nilsson et al., 1995; Meana et al., 1998; Tomczuk et al., 2014).

Other techniques include the detection of parasite-specific antibodies in serum (Höglund et al., 1995; Proudman and Trees, 1996a,b; Skotarek et al., 2010), the detection of parasite antigens in serum or feces (Kania and Reinemeyer, 2005; Skotarek et al., 2010), and the PCR amplification of parasite DNA in feces (Drogemüller et al., 2004).

Related to specificity, the findings of a recent study suggest that the 12/13 kDa excretory/secretory *A. perfoliata* antigen detected by current immunodiagnostic methods is common to both these tapeworm species, determining a risk of misdiagnosing *A. perfoliata* in areas in which *A. magna* also exists (Bohórquez et al., 2012). Other current diagnosis methods may not discriminate accurately between both *Anoplocephala* spp. The high variability of sensitivity of *A. perfoliata* copro diagnosis test can be due to the higher sensitivity of coprology in detecting *A. magna* than *A. perfoliata* and the morphological similarity between the eggs of both species (Bohórquez et al., 2014).

The introduction of molecular techniques has allowed for the accurate identification of parasite species and the determination of genetic diversity among parasite

populations according to ribosomal DNA (rDNA) markers. The abundance of rDNA in the body has led to the development of highly sensitive diagnostic techniques. Internal transcribed spacer (ITS) sequences have been a popular target of such techniques because this non-coding part of the gene has high polymorphism, that allows for species differentiation, so it have become very popular for investigating the inter- and intraspecific variation of different cestode groups (Bowles et al., 1995; Okamoto et al., 1997; Verneau et al., 1997; Van Herwerden et al., 1998, 2000; Verweij et al., 2000; Zehnder and de Chambrier, 2000; Drogemüller et al., 2004).

To date, only specific primers for the PCR-amplification of rDNA have been described for *A. perfoliata* (Drogemüller et al., 2004). The aim of this work was the design of an specific multiplex PCR procedure that lead to a detection of the three tapeworm species by designing new pair of primers for *A. magna* and *A. mamillana*. To do this, the sequencing of several regions of the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) in *A. magna* was also required. Finally, the development and validation of this diagnostic tool designed to simultaneously identify the three known equine tapeworms is described.

2. Materials and methods

2.1. Reference tapeworms

Adult *A. perfoliata*, *A. magna* and *A. mamillana* tapeworms were collected from the intestines of slaughtered horses at abattoirs in different Spanish regions (Andalucía, Madrid-Guadalajara and León, located in south, central and north of Spain, respectively). After cleaning with saline solution, specimens were morphologically identified (French and Chapman, 1992) and preserved in 70% ethanol until use.

3. DNA extraction

3.1. Cestodes

Genomic DNA was isolated from four proglottids obtained from each of the three morphologically identified species of adult tapeworm. Each sample was ground in 5 ml water (PCR-quality) using a glass macerator. After adding a further 5 ml of water, the suspension was filtered and centrifuged for 3 min at 1200 rpm. The supernatant was discarded and DNA extracted from the sediment using the Magna Pure Compact Nucleic Acid isolation Kit I (Blood protocol, Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, Spain) in a Magna Pure Compact station according to the manufacturer's instructions. The DNA was quantified using NanoDrop® and stored at –20 °C until use. Negative controls were run in parallel to detect possible contamination.

3.2. Eggs

Eggs were obtained directly from gravid proglottids of each tapeworm species by cutting the proglottids with a lancet in a Petri dish. Once their presence was verified under the microscope, the contents were washed with

saline solution into a 10 ml tube. The eggs were then filtered, concentrated by centrifugation and counted in a Neubauer chamber. Aliquots containing approximately 6000 eggs/ml of *A. magna* and *A. perfoliata* were stored in 70% ethanol until DNA extraction. DNA was extracted as described above for the proglottids. No gravid proglottids of *A. mamillana* were available for egg collection.

3.3. Negative control fecal samples

Feces from a tapeworm-free horse (confirmed by necropsy) were divided into 5 g portions, and additionally were checked to be free of eggs by specific tapeworm coprology (Meana et al., 1998). The sediments obtained once confirmed parasite negative were preserved in aliquots (1 ml stool sediment) in 70% ethanol until use as described in validation of technique.

4. Tapeworm species, ITS amplification and generic primer design

4.1. Genetic studies on ITS regions

All sequences of the three species of tapeworm available in GenBank™ at the start of multiplex PCR design are provided in Table 1. Due to the absence of data for *A. magna*, genetic studies on ribosomal ITS regions were performed, since these regions had been identified as the most accurate species marker.

Horse tapeworm published ribosomal sequences were compared using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) to identify conserved regions.

Generic *Anoplocephala* spp. primers were designed to amplify the end of 18S up to 5.8S using Primer3 software (<http://simgene.com/Primer3>) on the sequence of *A. perfoliata* AJ578153.1 (ITS1 primers: Forward (F) 5'-TGCTGAGAAGACGACCAAC-3' and reverse (R) 5'-CACACAGTTGGCTGCACTCT-3'). These primers were tested with reference tapeworms (*A. magna*, *A. mamillana* and *A. perfoliata*) to compare Spanish sequences due to problematic alignments got with the sequences available at Genebank.

To get information on *A. magna* ITS2 region, *A. perfoliata* AJ578153.1 and *A. magna* AY586610 were also compiled with ClustalW. Primers were designed as previously described (ITS2 primers: Forward (F) 5'-AGAGTGCAGCCAACTGTGTG-3' and reverse (R) 5'-ATCGGACTCGTGCCAGTATT-3') intended to amplify the end of 5.8S up to 28S region, and tested only against *A. magna* reference tapeworm.

Primer suitability (G+C content and melting temperature) was assessed using IDT OligoAnalyzer software (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>). Potential primer interactions (hairpin, homodimer and heterodimer structures for the two primers) were tested using the AutoDimer program (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>).

The annealing temperatures of the ITS primer pairs were empirically determined in a gradient PCR (55–65 °C) in a singleplex PCR reaction.

The PCR conditions used for ITS1 or ITS2 amplification were as follows: 25 µl reaction cocktail containing 12.5 µl Fast Start PCR Master (3 mM Cl₂Mg; Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, Spain), 0.4 µM of each primer, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, and 2.5 µl of an *Anoplocephala* spp. DNA template. All PCRs were performed in a Mastercycler ep gradient S (Eppendorf). The thermocycler program consisted of 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 65.6 °C, and 45 s at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 7 min. All the PCR products were analyzed by capillary electrophoresis in a QIAxcel System using a QIAxcelDNA High Resolution Kit (Qiagen, Las Matas, Madrid, Spain) to check the size of amplicons obtained.

Negative controls were run in parallel to detect possible contamination. Amplicons obtained with the three different species were purified (Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen, Las Matas, Madrid, Spain) and then sequenced in both directions in an Applied Biosystem Genetic Analyzer 3730 automated sequencer. The sequence data obtained were visually checked using the Clustal W method (Thompson et al., 1997) implemented in Chromas 1.43 software and compared using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) with the sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. Triplex PCR

5.1. Specific primers design

Based on the sequences obtained on ITS *A. magna* and after alignment with available data of the other horse tapeworm species, ITS2 was selected for the design of specific primers for *A. mamillana* and *A. magna* (Table 2). Design, primer suitability and primer interactions were also performed as described above. The design was focused on the final objective of the triplex PCR (different amplicon size and same optimum annealing temperature) to be combined with the previously published primers for *A. perfoliata* detection (AP-ITS2-3F and AP-ITS2-2R; amplicon size 254 bp; Drogemüller et al., 2004). So, G or GC tails were added to the 5' ends when needed to equally set the melting temperatures of each primer.

5.2. Optimization of PCR conditions

Singleplex PCR: checking and optimizing the procedure. Each specific primer for *A. mamillana*, *A. magna* and the published *A. perfoliata* primers were used in singleplex to empirically test the optimum primer's concentration (from 0.3 to 0.6 µM) and the annealing temperature (59–68 °C). All reactions were performed in 25 µl reaction cocktail using Fast Start PCR Master (see above), 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, and 2.5 µl of an *Anoplocephala* spp. DNA template. The thermocycler program consisted of 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles, of 30 s at 95 °C, 30 s at 59–68 °C, and 45 s at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 7 min. For each PCR, positive (DNA extracts from tapeworms identified by necropsy) and negative (H₂O) controls were run along. PCR amplicons were analyzed in a QIAxcel System as described before.

Table 1

Partial gene sequences published in the literature for the three tapeworm species at the start of work.

Tapeworm	GenBank™ accession no.	Gene sequence	References
<i>A. mamillana</i>	AJ578155	18S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – 28S	Drogemuller et al. (2004)
	AJ578154	18S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – 28S	Drogemuller et al. (2004)
	AY569770	28S	Wickström et al. (2005)
<i>A. magna</i>	AY586610	28S	Wickström et al. (2005)
	AB099691	COX-1	Mochizuki et al. (2006)
	AY568206	COI	Wickström et al. (2005)
<i>A. perfoliata</i>	AJ578151	18S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – 28S	Drogemuller et al. (2004)
	AJ578152	18S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – 28S	Drogemuller et al. (2004)
	AJ578153	18S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – 28S	Drogemuller et al. (2004)
	AY569769	28S	Wickström et al. (2005)
	AY752646	18S – ITS1 – 5.8S	Wickström et al. (2005)
	AB099690	COX-1	Mochizuki et al. (2006)
	AY568189	COI	Wickström et al. (2005)

Table 2Primers designed for the multiplex PCR-detection of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* based on the ITS-2 rDNA region.

Specific primers	Sequence ^a	PCR product size	Specificity	
A.magnaF1	<u>CCCGGGTTTGTGTGTGGAGTT</u>	382 pb	<i>A. magna</i>	This work
A.magnaR1	<u>CGCAACCTATTAACAGCTCA</u>			
AP-ITS2-3F	<u>AATTGTGGGGCTTCTCTTA</u>	254 pb	<i>A. perfoliata</i>	Drogemuller et al. (2004)
AP-ITS2-2R	<u>ACCTCGTGCCTTCTTTAT</u>			
A.mamillanaF1	<u>CGCGCCTCACCCAATATGCAATTG</u>	430 pb	<i>A. mamillana</i>	This work
A.mamillanaR1	<u>GCGGCCCATATTACTCTTATCACATTGC</u>			

^a CG tails added to primers are underlined.

Triplex PCR: The three specific primers were tested in the same reaction in triplex PCR under the conditions indicated in the previous paragraph using 0.4 μM of each specific primer (A.magnaF1, A.magnaR1, AP-ITS2-3F, AP-ITS2-2R, A.mamillanaF1, A.mamillanaR1), 2.0 μl of each tapeworm spp. DNA template (70 ng) and 60 °C as annealing temperature.

5.3. Triplex PCR validation: reproducibility, sensitivity and specificity

Reproducibility: aliquots of negative control fecal samples were spiked with proglottids of *A. magna*, *A. perfoliata* or *A. mamillana*, or a mix of the three species; as well, non-infected aliquots were tested to ensure that the specimens exhibited accurate, interpretable and reproducible DNA types. Each sample was tested in triplicate.

DNA isolated from parasites from two different geographic regions of Spain (Guadalajara and León provinces) were both tested to check that the geographical origin of each tapeworm species did not interfere with the diagnostic tool.

Sensitivity: these experiments were performed on serial dilutions of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* DNA prepared from macerated cestodes or the eggs of each species. The Nanodrop method was used to calculate the concentrations of DNA extracted from each adult tapeworm or egg sample.

Sensitivity was determined by individually testing *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* samples and then testing a mixture of the three species to establish the system's capacity to detect the components of mixed specimens and define the limitations of the triplex-PCR procedure.

The sensitivity of the triplex PCR procedure was determined in three types of sample: (a) 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 and 1/5000 dilutions of 70 ng of genomic DNA of the three tapeworm species, (b) DNA extracted from negative aliquots of sediments of negative control fecal samples spiked with 500, 200, 100, 50 and 10 eggs (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A. mamillana* eggs available) and (c) DNA extracted from 80, 50, 40, 30, 10 and 1 eggs per 2 μl of PCR reaction mix (only for *A. magna* and *A. perfoliata*; no *A. mamillana* eggs available).

Specificity: Each primer pair was tested on DNA isolates of the other two Anoplocephalidae species, as well as on DNA isolates of other relevant equine parasites like *Gasterophilus intestinalis*, *Parascaris equorum* and *Strongylus vulgaris*, to rule out cross amplifications.

All validations involved three PCRs performed on three different days using the parameters selected (annealing temperature 60 °C and 0.4 μM of each primer). The products of each PCR were capillary electrophoresed. Negative controls were run in parallel to detect possible contamination.

6. Results

6.1. Genetic studies on ITS regions

For both pair of primers, best amplicons were obtained when the annealing temperature was set at 65.6 °C and that was the subsequent temperature employed.

In the ITS1, sequence from the three tapeworm tested species were obtained. The reliable nucleotide fragment of the sequences is available at Genebank: 766 bp for *A. magna* (Accession number KJ934711), 681 bp for

A. perfoliata (Accession number KJ934713) and 630 bp for *A. mamillana* (Accession number KJ934712).

Upon alignment of all available sequences for *Anoplocephala* spp., the published AY752646 for *A. perfoliata* showed a 96% similarity with the Spanish *A. magna* new sequences KJ934711.

For the ITS2, sequences of four different *A. magna* isolates were obtained and are available at GeneBank® under the accession numbers KF956074–KF956077. The reliable nucleotide fragment in this case was between 906 bp and 917 bp.

6.2. Triplex PCR

Primer sequence designed for specific detection of *A. magna* and *A. mamillana* are shown in Table 2 and Fig. 1. In singleplex tests, PCR test conducted on the three primer pairs, best PCR products were obtained when the annealing temperature was set between 55 °C and 61 °C. The temperature selected for subsequent assays was 60 °C since this was the highest temperature at which amplicons could clearly be seen, consequently reducing the unspecific amplification risk. After checking the different primer concentrations in the PCR mixture (0.3–0.6 µM, data not shown), an equimolar concentration of 0.4 µM was fixed to reduce primer-dimer reactions.

All the PCR yielded the expected amplicons: 382 bp for *A. magna*, 430 bp for *A. mamillana* and 254 bp for *A. perfoliata* when tested on genomic DNA samples isolated from four *A. magna*, three *A. mamillana* and three *A. perfoliata* adult tapeworms respectively and no undesirable amplicons were detected by capillary electrophoresis.

The specificity of the three pair of primers was demonstrated for the three tapeworm species. The two new primers to identify *A. magna* and *A. mamillana* showed a clear specificity. As shown in Fig. 2, no PCR product was yielded when we used primers specific for *A. magna* on genomic DNA from a single adult *A. mamillana* or *A. perfoliata* specimen. The same occurred when we used primers specific for *A. perfoliata* on genomic DNA isolated from the other two species. Finally, using the three pairs of primers in the multiplex PCR procedure on DNA samples extracted from the three tapeworm species, three bands of different molecular weight were observed corresponding to each of the species tested. No PCR product was detected using the three primer pairs on negative controls (DNA-free samples). The geographical origin of each tapeworm species did not interfere with the results (data not shown).

No cross amplification was observed against the DNA of *G. intestinalis*, *P. equorum* and *S. vulgaris* (Fig. 3).

When conducting PCR amplification using the three primer pairs, 1/100 (0.7 ng/µl) was the maximum dilution of positive control genomic DNA found to render specific products of the three species. The next dilution (1/500; 0.14 ng/µl) only served to identify *A. magna* and *A. mamillana* but not *A. perfoliata*. Further dilutions proved negative for all three species (Fig. S1).

Supplementary Fig. S1 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.002>.

When we tested the PCR sensitivity using the primers specific for *A. magna* and *A. perfoliata* on fecal samples spiked with 500–10 eggs of the two species, 50 eggs was the minimum amount detectable for both species (Fig. S2). Using serial dilutions of pure DNA prepared using 80–1 eggs of each species/2 µl DNA template in 25 µl of PCR mix, all dilutions rendered amplified products of *A. magna*, whereas the most diluted *A. perfoliata* sample to score positive was the DNA sample extracted from 10 eggs (Fig. S3).

Supplementary Figs. S2 and S3 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.002>.

Results are reproducible as can be seen in Fig. S4, even at maximum dilutions rendering a positive result in the sensitivity tests (10 eggs/2 µl) (Fig. S5).

Supplementary Figs. S4 and S5 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.002>.

7. Discussion

The present study was designed to facilitate the differential diagnosis of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana* by way of a new PCR procedure based on identifying the hypervariable ITS-2 rDNA gene region of equine tapeworms.

Adult tapeworm proglottids from *A. perfoliata*, *A. magna* and *A. mamillana* were identified in a single multiplex PCR by amplicon size. According to previous accessible information for *A. perfoliata* and *A. mamillana* and the new DNA sequences obtained here for *A. magna*, the three species show high similarity in their 18S, 5.8S and 28S rDNA regions, while the ITS-2 region was observed to show greater variability. Thus, PCR-product sizes varying from 496 bp to 592 bp were observed for the three species and these differences were sufficient to design two new pairs of specific primers yielding different sized amplicons for *A. magna* (382 bp) and *A. mamillana* (450 bp). Using these primers along with previously described *A. perfoliata* primers (254 bp) as templates, the new method is able to easily differentiate the three species in samples of adult specimens, feces containing eggs or eggs obtained from feces.

Due to alignment difficulties, we were unable to use the Genbank AY752646 sequence available for an individual tapeworm identified as *A. perfoliata* in our alignments of all the existent sequences using the Clustal W method (Thompson et al., 1997), given its greater similarity with the sequences obtained for *A. magna*. There is a clear need to check the veracity of the information provided by Genbank as erroneous sequences have been often published.

The method proposed should facilitate the specific diagnosis of equine tapeworms especially in areas where co-infection is present. The fact that serological diagnosis may lead to misdiagnosing of *A. perfoliata* when *A. magna* is present (Bohorquez et al., 2012) could partly explain why the relationship between a colic syndrome and the presence of *A. perfoliata* based on serological detection has not been unanimously demonstrated. While some authors have found a clear link between *A. perfoliata* and colic (Proudman and Trees, 1999; Veronesi et al., 2009) others

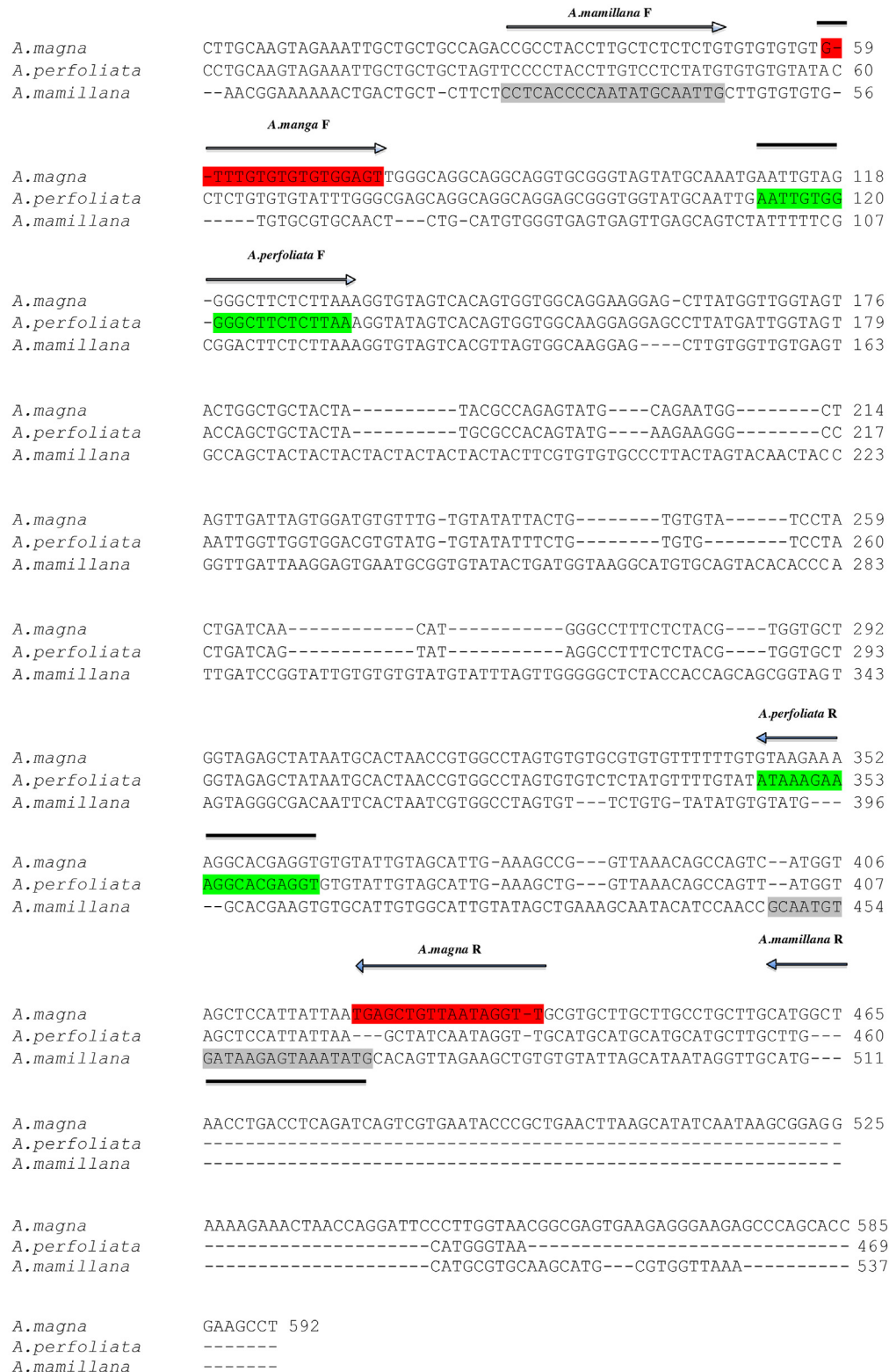


Fig. 1. ITS-2 rDNA sequence alignments for *A. magna* (592 bp; GenBank Accession No. KF956074), *A. perfoliata* (469 bp; GenBank Accession No. AJ578153) and *A. mamillana* (537 bp; GenBank Accession No. AJ578155).

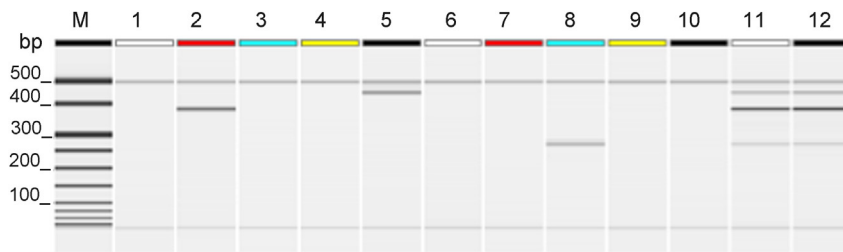


Fig. 2. Specificity of the multiplex PCR procedure determined by capillary electrophoresis. Lane M – DNA size marker (ordinate values in bp), lane 1 – negative control lacking DNA, lanes 2–4 – primers specific for *A. magna* plus genomic DNA from one adult *A. magna* (lane 2), *A. mamillana* (lane 3) or *A. perfoliata* (lane 4) specimen, lanes 5–7 primers specific for *A. mamillana* plus genomic DNA from one adult *A. mamillana* (lane 5), *A. magna* (lane 6) or *A. perfoliata* (lane 7) specimen, lanes 8–10 – primers specific for *A. perfoliata* plus genomic DNA from one adult *A. perfoliata* (lane 8), *A. magna* (lane 9) or *A. mamillana* (lane 10) specimen, lanes 11 and 12 – three pairs of primers on a mixed sample of DNA from all three tapeworm species.

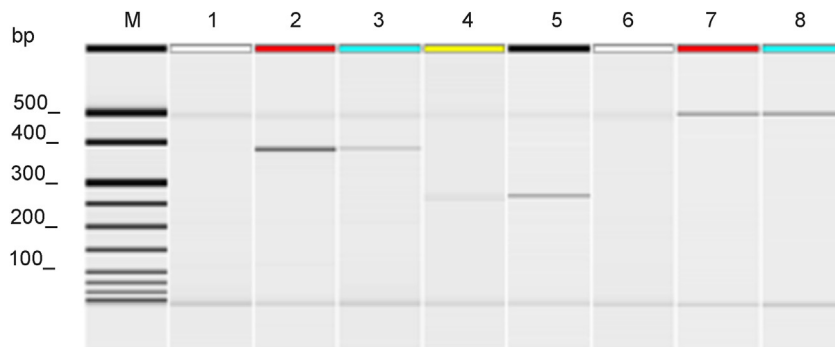


Fig. 3. Specificity of the multiplex PCR, lane M – DNA size marker (ordinate values in bp), lane 1 – negative control lacking DNA, lanes 2–3 – primers specific for *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana*. Genomic DNA from one adult *A. magna*, *G. intestinalis*, *P. equorum* and *S. vulgaris*, lanes 2–3. Genomic DNA from one adult *A. perfoliata*, *G. intestinalis*, *P. equorum* and *S. vulgaris*, lanes 4–5. Genomic DNA from one adult *G. intestinalis* (lane 6), *P. equorum* (lane 7) and *S. vulgaris* (lane 8).

do not (Traversa et al., 2008; Trotz-Williams et al., 2008; Back et al., 2013). Our multiplex PCR on animals suffering from digestive perturbances can easily detect the presence of *A. perfoliata* and/or *A. magna* and facilitates the specific diagnosis.

In conclusion, this paper describes the simultaneous PCR detection of *A. magna*, *A. perfoliata* and *A. mamillana*. Based on ITS-2 PCR protocols, the easy multiplex PCR procedure proposed offers scope for species-specific differentiation of the three tapeworms known to affect horses. Our findings indicate the possibility of running three separate singleplex PCRs in one multiplex PCR to detect DNA in tapeworm and/or egg-containing fecal samples. The PCR methods developed could be useful for the routine laboratory detection and differentiation of the three tapeworm species in horse fecal samples in areas where the three tapeworms are endemic.

The use of this technique could help to identify *A. perfoliata* among other tapeworm infections by PCR and get a more clear spectrum of the pathological repercussions of this cestode.

References

- Back, H., Nyman, A., Osterman, L.E., 2013. The association between *Anoplocephala perfoliata* and colic in Swedish horses – a case control study. *Vet. Parasitol.* 197, 580–585.
- Barclay, W.P., Phillips, T.N., Foerner, J.J., 1982. Intussusception associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in five horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 752–753.
- Beroza, G.A., Barclay, W.P., Phillips, T.N., 1983. Cecal perforation and peritonitis associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in three horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 804–806.
- Beroza, G.A., 1986. Laboratory Diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* Infection in Horses. The American Association of Equine Practitioners, Nashville, TN, USA, pp. 436–439.
- Biglietti, G., Garbanati, B., 2000. Cecocolic intussusception in a thoroughbred yearling. *Equine Pract.* 22, 26–27.
- Bohorquez, A., Meana, A., Luzon, M., 2012. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens. *Vet. Parasitol.* 190, 87–94.
- Bohorquez, A., Meana, A., Pato, N.F., Luzon, M., 2014. Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*. *Vet. Parasitol.* 204, 396–401.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P., 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110, 317–328.
- Drogemuller, M., Beelitz, P., Pfister, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2004. Amplification of ribosomal DNA of *Anoplocephalidae*: *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. *Vet. Parasitol.* 124, 205–215.
- Faleiros, R.R., de Matos, J.J.R.T., Alves, G.E.S., Santos, R.d.L., de Matos, J.J.R., 2000. *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) associada a um caso de abdome agudo equino. *Rev. Bras. Med. Vet.* 22, 27–29.
- French, D.D., Chapman, M.R., 1992. Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. *Compend. Contin. Educ.* 14, 655–661.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses—significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131, 1–13.
- Gawor, J.J., 1995. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. *Vet. Parasitol.* 58, 99–108.
- Höglund, J., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Uggla, A., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. *Vet. Parasitol.* 59, 97–106.
- Ihler, C.F., Rootwelt, V., Heyeraas, A., Dolvik, N.J., 1995. The prevalence and epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in Norway. *Vet. Res. Commun.* 19, 487–494.

- Kania, S.A., Reinemeyer, C.R., 2005. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. *Vet. Parasitol.* 127, 115–119.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Swerczek, T.W., Crowe, M.W., 1983. Parasites in Kentucky Thoroughbreds at necropsy: emphasis on stomach worms and tapeworms. *Am. J. Vet. Res.* 44, 839–844.
- Meana, A., Luzon, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M., 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* 74, 79–83.
- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J., 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. *Res. Rev. Parasitol.-Rev. Ibér. Parasitol.* 3–4, 93–95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M., 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. *Vet. Parasitol.* 130, 233–240.
- Mochizuki, R., Endoh, D., Onuma, M., Fukumoto, S., 2006. PCR-based species-specific amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and its application in identification of GI nematode eggs in bovine faeces. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 345–351.
- Nilsson, O., Ljungström, B.L., Höglund, J., Lundquist, H., Uggla, A., 1995. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta Vet. Scand.* 36, 319–328.
- Okamoto, M., Agatsuma, T., Kurosawa, T., Ito, A., 1997. Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology* 115, 661–666.
- Oliver, D.F., Jenkins, C.T., Walding, J.P., 1977. Duodenum rupture in a nine-month-old colt due to *Anoplocephala magna*. *Vet. Rec.* 101, 80.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1992. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet. Rec.* 131, 71–72.
- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J., 1998. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet. J.* 30, 194–199.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996a. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. *Parasite Immunol.* 18, 499–506.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996b. Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. *Vet. Parasitol.* 61, 239–247.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1999. Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses. *Parasitol. Today* 15, 156–159.
- Rehbein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2011. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J. Helminthol.* 85, 409–414.
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R., 2013. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitol. Res.* 112, 407–413.
- Ryu, S.H., Bak, U.B., Kim, J.G., Yoon, H.J., Seo, H.S., Kim, J.T., Park, J.Y., Lee, C.W., 2001. Cecal rupture by *Anoplocephala perfoliata* infection in a thoroughbred horse in Seoul Race Park, South Korea. *J. Vet. Sci.* 2, 189–193.
- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P., 2010. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. *Vet. Parasitol.* 172, 249–255.
- Slocombe, J.O.P., 1979. Prevalence and treatment of tapeworms in horses. *Can. Vet. J.* 20, 136–140.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Szczepaniak, K.O., Grzybek, M., Studzińska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczeń-Karczmars, M., 2014. Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. *Parasitol. Res.* 113, 2401–2406.
- Traversa, D., Fichi, G., Campigli, M., Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C.J., Pellegrini, D., Perrucci, S., 2008. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda Cyclophyllidae). *Vet. Parasitol.* 152, 271–277.
- Trotz-Williams, L., Physick-Sheard, P., McFarlane, H., Pearl, D.L., Martin, S.W., Peregrine, A.S., 2008. Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. *Vet. Parasitol.* 153, 73–84.
- Van Herwerden, L., Blair, D., Agatsuma, T., 1998. Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology* 116, 311–317.
- Van Herwerden, L., Gasser, R.B., Blair, D., 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* 30, 157–169.
- Verneau, O., Renaud, F., Catzeffis, F., 1997. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* 14, 630–636.
- Verweij, J.J., Polderman, A.M., Wimmenhove, M.C., Gasser, R.B., 2000. PCR assay for the specific amplification of *Oesophagostomum bifurcum* DNA from human faeces. *Int. J. Parasitol.* 30, 137–142.
- Veronesi, F., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2009. *Anoplocephala perfoliata* infestation and colic in horses. *Vet. Res. Commun.* 33, S161–S163.
- Wickström, L.M., Haukisalmi, V., Varis, S., Hantula, J., Henttonen, H., 2005. Molecular phylogeny and systematics of anoplocephaline cestodes in rodents and lagomorphs. *Syst. Parasitol.* 62, 83–99.
- Zehnder, M.P., de Chambrier, A., 2000. Morphological and molecular analyses of the genera *Peltidocotyle* Diesing 1850 and *Othinoscotylex* Woodland 1933, and a morphological study of *Woodlandiella* Freze, 1965 (Eucestoda, Proteocephalidae), parasites of South American siluriform fishes (Pimelodidae). *Syst. Parasitol.* 46, 33–43.



Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens

Alejandro Bohórquez, Aránzazu Meana, Mónica Luzón*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2012

Received in revised form 1 June 2012

Accepted 5 June 2012

Keywords:

Anoplocephala magna

A. perfoliata

Antigens

Immunodiagnosis

ABSTRACT

The tapeworm responsible for equine colic, *Anoplocephala perfoliata*, is considered the most common intestinal tapeworm of horses worldwide. However, there is evidence that *Anoplocephala magna* has a similar prevalence in North America and Spain, and possibly in other countries, highlighting the need for diagnostic methods capable of distinguishing between these two species. Currently, immunodiagnosis of *A. perfoliata* is based on the identification of the 12/13 kDa excretory/secretory (E/S) *A. perfoliata* immunoreactive antigen, which while apparently specific, has never been tested in sera from *A. magna*-positive horses. Accordingly, we evaluated the specificity of 12/13 kDa E/S *A. perfoliata* antigen for the first time by testing this crude antigen against *A. magna*-positive sera in Western blot. In addition, we characterized a somatic (Som) crude antigen of *A. perfoliata* and for the first time, the E/S and Som crude antigens of *A. magna*, evaluating their potential utility for the differential serodiagnosis of equine anoplocephalosis in sera from horses of known parasitic status. SDS-PAGE revealed major low MW bands at: 14 and 12 kDa for E/S and Som-*A. magna*; 14 and 11 kDa for E/S *A. perfoliata*; and 11 and 10 kDa for Som-*A. perfoliata*. Protein regions at 12–14 kDa (E/S *A. perfoliata*), 10–15 kDa (Som-*A. perfoliata*) and 10–12 kDa (Som-*A. magna*) were recognized by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. These findings demonstrate cross-reactivity of these unpurified antigenic components, precluding their use in differential diagnosis between *A. perfoliata* and *A. magna*. Although these results do not directly indicate cross reactivity at the purified 12/13 kDa component of the E/S *A. perfoliata* antigen, it is possible that current immunodiagnostic methods based on this component might not accurately differentiate between these two tapeworm species, suggesting erroneous diagnosis of *A. perfoliata* in areas where *A. magna* is present.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anoplocephala perfoliata (Goeze, 1782), a cestode of the Anoplocephalidae family in the order Cyclophyllidea, is a common intestinal tapeworm of horses worldwide (Gasser et al., 2005). This cestode has been increasingly associated with bowel irritation, intussusceptions and intestinal obstruction in horses (review by Gasser et al., 2005). Sig-

nificantly, *A. perfoliata* increases the gravity of lesions and the risk of ileal impaction and spasmodic colic, particularly in horses chronically infected with many tapeworms (Proudman and Edwards, 1993; Proudman et al., 1998; Tinker et al., 1997; Rodríguez-Bertos et al., 1999; Traub-Dargatz et al., 2001). Accurate detection of this cestode is crucial for both epidemiological and clinical reasons. To date, several diagnostic strategies have been employed, including the detection of parasite eggs in faeces using centrifugation and flotation techniques (Beroza et al., 1986; Proudman and Edwards, 1992; Nilsson et al., 1995; Meana et al., 1998; Proudman and Trees, 1999; Rebhein

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943948; fax: +34 91 3943908.
E-mail address: mluzon@vet.ucm.es (M. Luzón).

et al., 2010), the detection of parasite-specific antibodies in serum (Höglund et al., 1995; Proudman and Trees, 1996a,b), the detection of parasite antigens in faeces (Kania and Reinemeyer, 2005), and amplification of parasite-specific DNA in faeces by PCR (Traversa et al., 2008). The advantages and disadvantages of each approach regarding sensitivity and specificity have been reviewed (Gasser et al., 2005), and their efficacies evaluated (Traversa et al., 2008; Skotarek et al., 2010). To date, all available diagnostic methods have been designed assuming that *A. perfoliata* is the only epidemiologically significant tapeworm to parasitize domestic horses in most parts of the world. However, this assumption does not hold true in countries where *Anoplocephala magna* is at least as prevalent as *A. perfoliata*, such as USA (data compiled by Lichtenfels, 1975). In Spain, prior to 2002, *A. perfoliata* was the only major tapeworm considered in anti-helminthic control strategies for Spanish equines, due to the absence of *A. magna* and a very low prevalence of *Anoplocephaloides mamillana* (Cordero del Campillo et al., 1994). However, since the first detection of *A. magna* in abattoirs in North and Central Spain (Meana et al., 2002), this cestode has been frequently detected throughout the country (about 18% *A. magna* versus 24% *A. perfoliata* with 11% cases of mixed infection) (Meana et al., 2005).

A. magna (Abilgaard, 1789) is a cestode that parasitizes the fore-regions of the small intestine of equines. Little information is available regarding its possible pathogenic role and only a few reports of clinical disease have been associated with massive infections (Oliver et al., 1977; Faleiros et al., 2000). Given the limited pathogenicity of this tapeworm, the time consuming process of examining the entire small intestine and the failure of coprological tests to differentiate between *A. magna* and *A. perfoliata* eggs, *A. magna* infections generally pass unnoticed. Thus, a diagnostic method is required to discriminate between *A. perfoliata* and *A. magna* infections. Most of the currently available immunodiagnostic methods (Western blot analysis, serum-based ELISA, coproantigen ELISA) are based on the use of either E/S *A. perfoliata* crude antigen (Proudman and Trees, 1996a) or its purified 12–13 kDa immunoreactive component (Proudman and Trees, 1996b). The specificity of these antigens for the diagnosis of *A. perfoliata* is supported by the absence of cross-reactivity with protein antigens from *A. mamillana* and other helminths (Proudman and Trees, 1996a,b). However, to the best of our knowledge, this antigen has never been tested against *A. magna*-positive sera. In this study we tested *A. magna* sera against E/S *A. perfoliata* crude antigen for the first time in Western blots, evaluating the specificity of the 12/13 kDa component. In addition, we used SDS-PAGE to characterize the somatic crude antigen of *A. perfoliata* and, for the first time, the excretory/secretory and somatic crude antigens of *A. magna*, assessing their potential use in the differential serodiagnosis of equine anoplocephalosis by Western blot analysis. Our findings indicate the existence of low MW immunoreactive components of E/S *A. perfoliata*, Som-*A. perfoliata* and Som-*A. magna* antigens that are recognized by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. The data suggest that the tools currently available for

immunodiagnosis may not accurately distinguish between these two species.

2. Materials and methods

2.1. Processing of individual horses

Full gastrointestinal tracts were obtained in multiple samplings between 2006 and 2010 from horses slaughtered at two abattoirs, one located in Segovia (Central Spain) and the other in León (Northern Spain). Digestive tracts were taken to the respective Veterinary Medicine faculties (University Complutense of Madrid or the University of León) within 1 h of slaughter and fully opened in the necropsy room, where the entire mucosal surface of each gastrointestinal tract ($n = 179$) was examined macroscopically for the presence of parasites. All tapeworms were removed, counted, classified as *A. perfoliata* or *A. magna* according to their location and morphology, and stored in phosphate buffered saline (PBS). A blood sample was taken when possible from the mesenteric veins of each gastrointestinal tract and the sera collected was stored at -20°C .

2.2. Antigen preparation

E/S antigens for each *Anoplocephala* sp. were prepared as described by Proudman and Trees (1996a), with minor modifications. Live worms were washed twice for 5 min with a saline/glucose/antibiotic solution (0.9% NaCl, 2.5 mg ml^{-1} glucose, 200 U.I. ml^{-1} penicillin, $200\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin) at 37°C . Groups of worms (40–60 *A. perfoliata* versus 10–20 *A. magna*) were placed in 100 ml of PBS (pH 7.2) and incubated at 37°C for 5 h. Harvested incubation medium was centrifuged twice at $2000 \times g$ for 20 min at 5°C . The supernatants were then removed and, after the second spin, filtered successively through $1.8\text{ }\mu\text{m}$, $0.8\text{ }\mu\text{m}$ and $0.22\text{ }\mu\text{m}$ syringe filters (ALBET®).

For somatic antigen preparation, groups of previously identified scolices and first proglottids of worms from each *Anoplocephala* sp. were selected (Proudman and Trees, 1996a), repeatedly washed in PBS and stored at -20°C . After thawing, the material was collected in a small volume of PBS in a glass tissue grinder and homogenized on ice (Höglund et al., 1995). The homogenized material was sonicated 10 times (15 s per cycle with 15 s cooling intervals) at 20 kHz in an ultrasonic disintegrator (SONOPLUS HD 2070, LABOLAN, Spain). The sonicated material was then centrifuged for 30 min at $14,000\text{ r.p.m.}$ (Sahu et al., 2009) and the supernatant was collected and filtered successively through $1.8\text{ }\mu\text{m}$, $0.8\text{ }\mu\text{m}$ and $0.22\text{ }\mu\text{m}$ syringe filters (ALBET®).

For both types of antigen, the protein was quantified by the method Bradford (1976) using the Protein Assay kit 2 (Bio-Rad, Hercules, USA), with bovine serum albumin as the standard. Samples were stored at -20°C until use.

2.3. SDS-PAGE characterization

Several batches of each antigen were analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at the Proteomics Facility

of the UCM-PCM, a member of ProteoRed-ISCIII network. Samples were reduced by boiling in 5% 2-mercaptoethanol and electrophoresed in 15% polyacrylamide gels. Approximately 20 µg of antigen was loaded per well in a total volume of 25 µl. Molecular weight markers (Precision Plus Protein™ Standards Bio-Rad, Hercules, USA) of a wide molecular spectrum (10–250 kDa) were run adjacent to the antigens. Proteins were visualized with colloidal Coomassie blue (CCB) stain.

2.4. Western blot analysis

The separated proteins were transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes at the Proteomics Facility of the UCM-PCM, and visualized using Ponceau red stain. Immunoblot analysis was performed according to the Protein Blotting Guide (Bio-Rad, 2006). Vacant protein binding sites were blocked with 5% skimmed milk powder (SMP) in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h. The PVDF membranes were cut into strips and incubated for 1 h with individual test sera diluted 1:250 in 5% SMP/TTBS (0.05% Tween in TBS) at room temperature. After incubation with test sera, the membranes were washed in TTBS (3 × 5 min) and incubated for 1 h at room temperature with rabbit anti-horse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:1000 in 5% SMP/TTBS, followed by washes in TTBS (2 × 5 min) and TBS (5 min). The PVDF strips were then incubated for 20 min at room temperature in substrate (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride at 0.5 mg ml⁻¹ in TBS; HRP Color Development Reagent, DAB Blotting grade, BioRad) containing 3% hydrogen peroxide, at a dilution of 1:1000. After incubation, membranes were washed with distilled water (2 × 10 min) and dried in air.

2.5. Characterization of the sera analyzed

A total of 135 serum samples were collected from horses following necropsy via a full-length cut along the gut. Due to the post-mortem source of the blood and the site of collection (mesenteric veins), many sera samples had to be excluded from the experiment because of poor quality and/or insufficient sample volume. In order to avoid recently cleared infections in animals selected as negative controls, tapeworm-negative sera samples collected other than in autumn/winter seasons were discarded, based on previous evidences on *A. perfoliata* seasonality in Spain which indicated a yearly summer to spring pattern of infection of horses (Meana et al., 2005). Finally, 20 samples were chosen on the basis of their quality, quantity and tapeworm infection status, to study the immunogenic reactivity of the four antigens in western blots. The samples included sera from horses specifically classified as *A. magna*-positive only (*n* = 8), *A. perfoliata*-positive only (*n* = 6), *A. perfoliata*- and *A. magna*-positive (*n* = 1) or tapeworm negative (*n* = 5). Sera samples were examined in Western blots first with E/S *A. perfoliata* and *A. magna* antigens (all 20 sera samples) and subsequently with Som-*A. perfoliata* and *A. magna* antigens (11 sera samples). Due to insufficient sample volume, 9 sera were run out before being probed with the somatic antigens. Western blot assays were repeated up

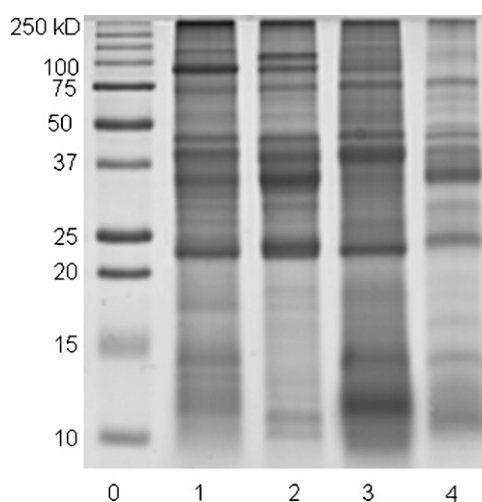


Fig. 1. Characterization of antigens by SDS-PAGE. Lane 0: molecular weight markers; lane 1: Som-*A. magna* antigen; lane 2: Som-*A. perfoliata* antigen; lane 3: E/S *A. magna* antigen; lane 4: E/S *A. perfoliata* antigen.

to three times to verify the reproducibility of the results. The parasitic status of the animals was recorded, indicating tapeworm burdens and the presence of other digestive parasites (Table 1).

3. Results

Of a total of 179 horses analyzed by necropsy, 42 were parasitized by *A. perfoliata*, 22 by *A. magna* and 19 by both *A. perfoliata* and *A. magna*. The maximum parasitic load was 476 tapeworms for *A. perfoliata* and 76 for *A. magna*.

3.1. SDS-PAGE

For the E/S *A. perfoliata* antigen (Fig. 1, lane 4), the major protein bands were detected at 81, 47, 41, 35, 30, 25, 17, 14 and 11 kDa, while the Som-*A. perfoliata* antigen (Fig. 1, lane 2) revealed major bands at 120, 94, 75, 45, 40, 34, 30, 23, 11 and 10 kDa. Major bands were detected for the E/S *A. magna* antigen (Fig. 1, lane 3) at 94, 77, 46, 40, 23, 14 and 12 kDa, and for the Som-*A. magna* antigen (Fig. 1, lane 1) at 136, 92, 73, 45, 40, 34, 23, 18, 14 and 12 kDa.

3.2. Western blot analysis

Low MW (<15 kDa) bands were detected for three of the four crude antigens against most tapeworm-positive sera, and each antigen presented a specific pattern of bands (Figs. 2–4). The low MW proteins recognized by each serum are shown individually (Table 2).

For the E/S *A. perfoliata* antigen, a protein region at 12–14 kDa was recognized by sera from all *A. perfoliata*-positive horses (Fig. 2, lanes 5–8), 5 of the 8 *A. magna*-positive horses (Fig. 2, lanes 1, 2 and 4), and by the *A. perfoliata*-plus *A. magna*-infected serum, but not by any sera from tapeworm-negative horses (Fig. 2, lanes 9 and 10). Comparable recognition patterns were observed in all replicates of the assay (see Table 2).

Table 1

Parasite infection status of 20 animals selected for serum analysis after post-mortem examination. Tapeworm burdens (individual intensities) as well as detection of other digestive parasites expressed as positive (+) versus negative (–) are shown.

Horse	Ap	Am	<i>Parascaris</i>	Cyatostominae	<i>Strongylus</i>	<i>Gasterophilus</i>
1	–	10	+	+	+	+
2	–	76	–	–	+	+
3	–	30	–	–	–	–
4	–	4	–	+	+	+
5	138	–	+	+	–	+
6	46	–	–	+	+	+
7	8	–	+	–	+	+
8	98	–	–	–	+	+
9	–	–	+	+	–	+
10	–	–	–	+	–	+
11	–	26	–	–	–	–
12	–	5	+	–	+	+
13	–	8	+	+	+	+
14	–	3	–	–	–	–
15	216	–	–	+	+	+
16	35	–	+	–	–	+
17	25	137	+	–	+	+
18	–	–	+	–	–	+
19	–	–	+	–	–	+
20	–	–	–	–	–	–

Ap, *A. perfoliata*; Am, *A. magna*.

For the Som-*A. perfoliata* antigen, a diffuse region at 10–15 kDa (Fig. 3) was recognized by sera from most *A. perfoliata*-positive and *A. magna*-positive horses, although the results for 1 *A. perfoliata*-positive and 2 *A. magna*-positive horses were not reproducible (Table 2 and Fig. 3, lanes 1, 3, 5). No such reaction was observed for sera from *Anoplocephala*-negative horses.

For the E/S *A. magna* antigen, no low molecular protein bands were clearly recognized by any sera from *Anoplocephala*-positive or -negative horses in any assay (Table 2 and Fig. 4).

Finally, for the Som-*A. magna* antigen, a protein region at 10–12 kDa (Fig. 5) was recognized by sera from most *A.*

magna-positive and *A. perfoliata*-positive horses, although the results for 1 *A. magna*-positive and 2 *A. perfoliata*-positive horses were not reproducible (Table 2 and Fig. 5, lanes 1 and 5). No such reaction was observed for sera from *Anoplocephala*-negative horses.

4. Discussion

Most immunodiagnostic methods currently used to detect *A. perfoliata* infection (Western blot analysis, serum-based ELISA, coproantigen ELISA) are based on the use of either E/S *A. perfoliata* crude antigen (Proudman and Trees, 1996a) or its purified 12/13 kDa immunoreactive

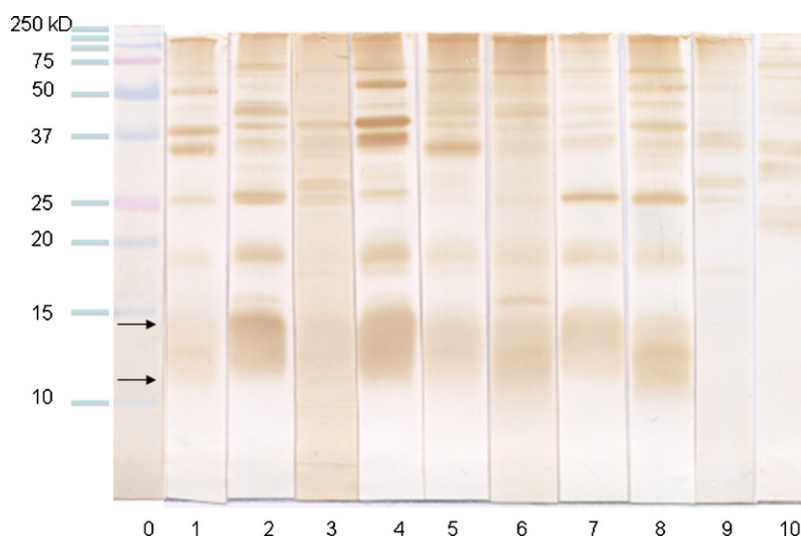


Fig. 2. Western blot analysis of immunoreactive proteins in E/S *A. perfoliata* antigen against some representative sera. The low MW region recognized by *Anoplocephala*-positive sera at genus level is labelled with arrows. Lane 0: molecular weight markers; lanes 1–4: sera from *A. magna*-positive horses (1–4 in Tables 1 and 2); lanes 5–8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5–8 in Tables 1 and 2); lanes 9 and 10: sera from tapeworm-negative horses (9 and 10 in Tables 1 and 2).

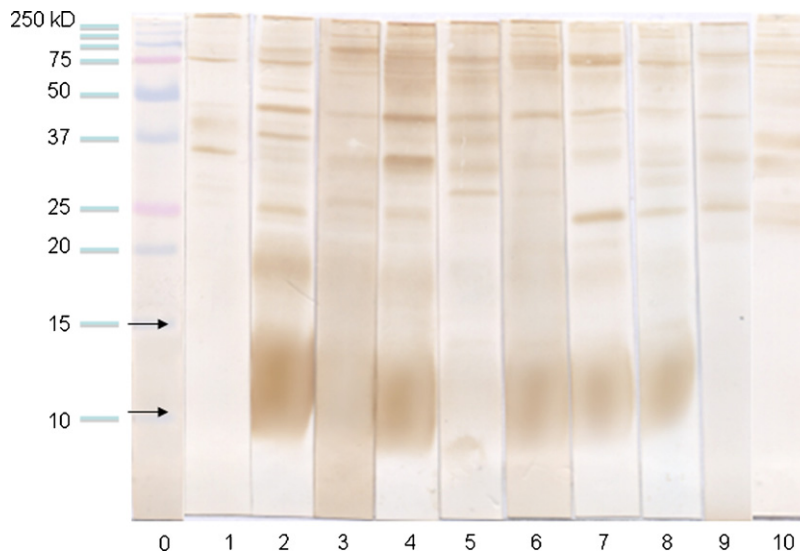


Fig. 3. Western blot analysis of immunoreactive proteins in Som-*A. perfoliata* antigen against some representative sera. The low MW region recognized by *Anoplocephala*-positive sera at genus level is labelled with arrows. Lane 0: molecular weight markers; lanes 1–4: sera from *A. magna*-positive horses (1–4 in Tables 1 and 2); lanes 5–8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5–8 in Tables 1 and 2); lanes 9 and 10: sera from tapeworm-negative horses (9 and 10 in Tables 1 and 2).

component (Proudman and Trees, 1996b). The specificity of these methods is supported by the lack of cross-reactivity between the 12/13 kDa component of the E/S *A. perfoliata* antigen and protein antigens from *A. mamillana* and other helminths (Proudman and Trees, 1996a,b). Our results corroborate this specificity as far as nematodes (*Parascaris*, *Strongylus*, *Cyathostominae*) and arthropods (*Gasterophilus*) are concerned, since no reactivity against this antigenic component was detected for sera from tapeworm-negative horses infected with these parasites. However, to the best of our knowledge, this antigen had never been tested

against *A. magna*-positive sera. Our results indicate that a 12–14 kDa region of the E/S *A. perfoliata* crude antigen is recognized by both *A. perfoliata*- and *A. magna*-positive sera, indicating cross-reactivity of these immunogenic components of E/S *A. perfoliata* antigen with *A. magna* protein antigens.

Other antigenic components of *A. perfoliata* have been described in the literature. Höglund et al. (1995) characterized a somatic crude antigen from scolices of *A. perfoliata* with the most prominent bands found within the 31–45 kDa and 66–200 kDa molecular weight (MW)

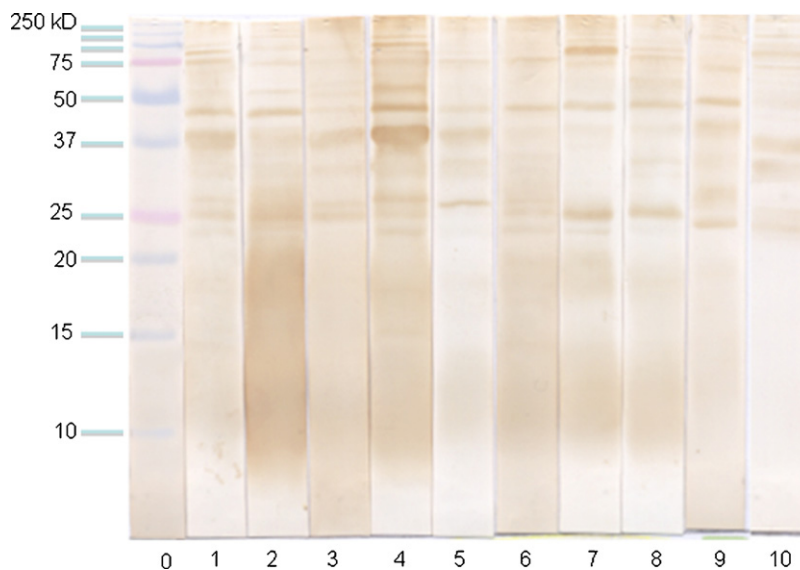


Fig. 4. Western blot analysis of immunoreactive proteins in E/S *A. magna* antigen against some representative sera. Lane 0: molecular weight markers; lanes 1–4: sera from *A. magna*-positive horses (1–4 in Tables 1 and 2); lanes 5–8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5–8 in Tables 1 and 2); lanes 9 and 10: sera from tapeworm-negative horses (9 and 10 in Tables 1 and 2).

Table 2

Serum recognition of low MW proteins, expressed as positive (+) versus negative (–), of 20 animals selected for Western blot (WB) analysis against the four antigens studied, showing the tapeworm status of the animals. Not reproducible results (variation between assays) are expressed as +/-.

Horse	Tapeworm burden		WB serum recognition of low MW proteins			
	Ap	Am	E/S Ap	E/S Am	Som-Ap	Som-Am
1	–	10	+	–	+/-	+/-
2	–	76	+	–	+	+
3	–	30	–	–	+/-	+
4	–	4	+	–	+	+
11	–	26	+	–	+	+
12	–	5	–	–	n.d.	n.d.
13	–	8	+	–	n.d.	n.d.
14	–	3	–	–	n.d.	n.d.
5	138	–	+	–	+/-	+/-
6	46	–	+	–	+	+/-
7	8	–	+	–	+	+
8	98	–	+	–	+	+
15	216	–	+	–	n.d.	n.d.
16	35	–	+	–	n.d.	n.d.
17	25	237	+	–	n.d.	n.d.
9	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	n.d.	n.d.
19	–	–	–	–	n.d.	n.d.
20	–	–	–	–	n.d.	n.d.

Ap, *A. perfoliata*; Am, *A. magna*; n.d., not performed.

ranges. The authors tested the antigen in Western blots and observed a heterogeneous banding pattern within the 50–70 kDa range, depending on the extent of tapeworm-related intestinal lesions. Accordingly, the major bands at 66 kDa and 70 kDa in *A. perfoliata*-positive sera were not observed in sera from tapeworm-negative horses with no intestinal lesions. In a subsequent study, a sequential pattern of bands at 10, 35, 45 and 66 kDa was reported, depending on the time since infection (Höglund et al., 1998). Our results with a homologous somatic *A. perfoliata* antigen revealed a wider pattern of recognition at the low MW level, with bands also detected at 23 kDa and

10–11 kDa. In contrast to the banding pattern described previously (Höglund et al., 1995), we found no differences between tapeworm-positive and tapeworm-negative sera above the 20 kDa level, whereas at lower MWs, a 10–14 kDa region was only present in tapeworm-positive sera. Again, this immunogenic component was recognized by both homologous (*A. perfoliata*) and heterologous (*A. magna*)-positive sera, indicating cross-reactivity.

Our results constitute the first description of the antigenic composition of *A. magna*. The protein pattern of the E/S *A. magna* antigen mainly differed from that of *A. perfoliata* due to the absence of bands within the 23–40 kDa

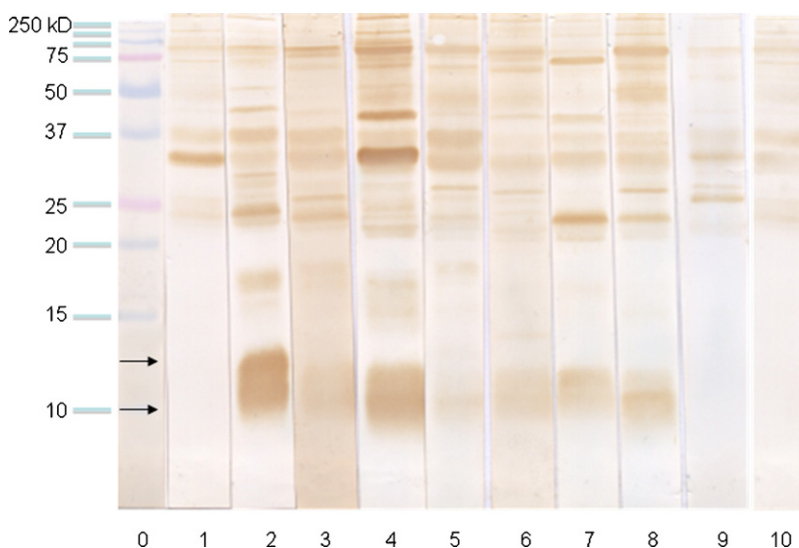


Fig. 5. Western blot analysis of immunoreactive proteins in Som-*A. magna* antigen against some representative sera. Lane 0: molecular weight markers; lanes 1–4: sera from *A. magna*-positive horses (1–4 in Tables 1 and 2); lanes 5–8: sera from *A. perfoliata*-positive horses (5–8 in Tables 1 and 2); lanes 9 and 10: sera from tapeworm-negative horses (9 and 10 in Tables 1 and 2).

range in E/S *A. magna*. The somatic *A. magna* antigen differed from its *A. perfoliata* counterpart in the presence of two bands at 18 and 14 kDa. Contrary to expected after SDS-PAGE analysis, there was no apparent reaction of E/S *A. magna* antigen at the lower MWs in Western blots with any homologous or heterologous sera. In fact this was not a unique result since the four antigens showed some SDS-PAGE bands apparently absent in Western blots and vice versa. The apparent absence of low MW bands in Western blots of E/S *A. magna* seems to indicate weak reactivity of those components against *Anoplocephala* positive sera, although other possibilities like the presence of an interfering substance in the antigen should be checked. As for the somatic *A. magna* antigen, reactivity was detected at 10–14 kDa but this was genus specific and evident for both *A. magna* and *A. perfoliata*-positive sera.

Using ELISA, a statistical correlation was described between infection intensity and specific IgG antibody levels against the 12/13 kDa affinity-purified component of excretory/secretory *A. perfoliata* antigen (Proudman and Trees, 1996b), which was proposed as a useful diagnostic measure of the risk of *A. perfoliata*-associated colic. However, this correlation could not be reproduced by other authors (Traversa et al., 2008; Skotarek et al., 2010). Considerable variation in antibody levels among horses with similar infection intensities has been described in serum ELISA with somatic antigen (Höglund et al., 1995). Interestingly, a seasonal pattern in antibody levels has also been described, reflecting the establishment of newly acquired infection (Höglund et al., 1995, 1998). As for our results, we found no apparent relationship between the intensity of infection and serum reactivity in Western blot for either *A. perfoliata* (the horse with the highest parasitic burden had the least reactive serum) or *A. magna* (one of the reactive sera came from a horse with only four tapeworms). However, our observations are not necessarily in conflict with those of Proudman and Trees (1996b) since Western blot is not a quantitative assay and any clear correlative relationship may well not be apparent with our western blot experiments. We can offer no simple explanation for the variation in reactivity among homologous sera. For example, the low or null reaction with the homologous E/S and somatic antigens observed for the serum from the horse with the highest *A. perfoliata* burden (138 tapeworms) cannot be easily attributed to a newly acquired infection, as the horse was slaughtered in late March when infection is generally well established (Meana et al., 2005). Other factors that affect serological results may account for the differences observed between homologous sera, such as individual variability in host immune response or modification of the host immune system by the parasite (Höglund et al., 1995; Proudman and Trees, 1996a,b).

In conclusion, our findings indicate the existence of low MW immunoreactive components of unpurified E/S *A. perfoliata*, Som-*A. perfoliata* and Som-*A. magna* antigens that are recognized by *Anoplocephala*-positive sera at the genus but not the species level. The cross-reactivity of these components precludes their use in differential diagnosis between *A. perfoliata* and *A. magna*. Although these results do not directly indicate cross reactivity at the purified 12/13 kDa component of the E/S *A. perfoliata* antigen,

it is possible that the current immunodiagnostic methods using this component might not accurately differentiate between these two tapeworm species, suggesting a risk of erroneous *A. perfoliata* diagnoses in areas where *A. magna* is present. To clarify this point, Western blots with the purified 12/13 kDa component of E/S *A. perfoliata* antigen should be assayed. Control programs with an epidemiological basis must rely on specific diagnoses. In the absence of specific antigenic components, the differential diagnosis between *Anoplocephala* spp. in horses would rely on post-mortem identification, underscoring the need for a molecular approach.

Acknowledgements

We acknowledge the “Universidad Complutense of Madrid” for financial support (Project PR1/07-14418-A). We gratefully thank Miss Nélida F. Pato for great help in the collection and processing of digestive tracts.

References

- Beroza, G.A., Marcus, L.C., Williams, R., Bauer, S.M., 1986. Laboratory diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses. In: The American Association of Equine Practitioners, 32nd Convention, Nashville, TN, USA, pp. 436–439.
- Bio-Rad, 2006. Protein Blotting Guide. A Guide to Transfer and Detection, 3rd edition, <http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin.2895.pdf> (accessed 28.07.11).
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cordero del Campillo, M., Castañón Ordóñez, L., Reguera Feo, A. (Eds.), 1994. Índice Catálogo de Zooparásitos Ibéricos., 2nd edition. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones, León, Spain.
- Faleiros, R.R., de Matos, J.J.R.T., Alves, G.E.S., Santos, R., de, L., de Matos, J.J.R., 2000. *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) asociada a um caso de abdome agudo equino. *Rev. Bras. Med. Vet.* 22, 27–29.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M.C., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses – significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131, 1–13.
- Höglund, J., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Ugglä, A., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. *Vet. Parasitol.* 59, 97–106.
- Höglund, J., Nilsson, O., Ljungström, B.L., Hellander, J., Lind, E.O., Ugglä, A., 1998. Epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in foals on a stud farm in south-western Sweden. *Vet. Parasitol.* 75, 71–79.
- Kania, S.A., Reinemeyer, C.R., 2005. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. *Vet. Parasitol.* 127, 115–119.
- Lichtenfels, J.R., 1975. Helminths of domestic equids. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 42 (special issue), 92.
- Meana, A., Luzón, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M., 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* 74, 79–83.
- Meana, A., Mateos, A., Pato, N.F., Pérez, J., 2002. First report of *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) in Spain. *Rev. Ibér. Parasitol.* 3–4, 93–95.
- Meana, A., Pato, N.F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M., 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. *Vet. Parasitol.* 30, 233–240.
- Nilsson, O., Ljungström, B.L., Höglund, L.H., Ugglä, A., 1995. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta Vet. Scand.* 36, 319–328.
- Oliver, D.F., Jenkins, C.T., Walding, P., 1977. Duodenum rupture in a nine-month-old colt due to *Anoplocephala magna*. *Vet. Rec.* 101, 80.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1992. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet. Rec.* 25, 71–72.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1993. Are tapeworms associated with equine colic? A case control study. *Equine Vet. J.* 25, 224–226.

- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J., 1998. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet. J.* 30, 194–199.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996a. Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. *Vet. Parasitol.* 6, 239–247.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996b. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. *Parasite Immunol.* 18, 499–506.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1999. Tapeworm as a cause of intestinal disease in horses. *Parasitol. Today* 15, 156–159.
- Rebhein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2010. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J. Helminthol.*, 1–6, <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X10000751>.
- Rodríguez-Bertos, A., Corchero, J., Castaño, M., Peña, L., Luzón, M., Gómez-Bautista, M., 1999. Pathological alterations caused by *Anoplocephala perfoliata* infection in the ileocecal junction of equids. *J. Vet. Med. A* 46, 261–269.
- Sahu, P.S., Parija, S.C., Narayan, S.K., Kumar, D., 2009. Evaluation of an IgG-ELISA strategy using *Taenia solium* metacestode somatic and excretory–secretory antigens for diagnosis of neurocysticercosis revealing biological stage of the larvae. *Acta Trop.* 110, 38–45.
- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P., 2010. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. *Vet. Parasitol.* 172, 249–255.
- Tinker, M.K., White, N.A., Thatcher, C.D., Pelzer, K.D., Davis, B., Carmel, D.K., 1997. Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet. J.* 29, 448–453.
- Traub-Dargatz, J.L., Koral, C.A., Seitzinger, A.H., Garber, L.P., Forde, K., White, N.A., 2001. Estimate of the national incidence of colic and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 67–71.
- Traversa, D., Fichi, G., Campligli, M., Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C.J., Pellegrini, D., Perrucci, S., 2008. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidae). *Vet. Parasitol.* 152, 271–277.